

**Mestrado em Zootecnia**

**Dissertação**

**Contributo para a Caracterização do Valor Nutritivo dos  
Fenos Produzidos no Alentejo**

*Jesuína de Fátima Saloio Rosalino*

**Orientador:**

**Professora Doutora *Ofélia Pereira Bento***

**Évora**

**Agosto de 2011**

**Mestrado em Zootecnia**

**Dissertação**

**Contributo para a Caracterização do Valor Nutritivo dos  
Fenos Produzidos no Alentejo**

*Jesuína de Fátima Saloio Rosalino*

**Orientador:**

**Professora Doutora *Ofélia Pereira Bento***

**Ao meu filho**

***Luís Alexandre***

**Por tudo o que representa para mim.**

Aproveito para transmitir quanto interesse me deu voltar a abordar estas matérias, quanto me motivou poder trabalhar para oferecer mais um pequeno contributo para a problemática do conhecimento dos factores ligados à qualidade dos fenómenos na região Alentejo e o quanto me conforta poder dar algo do meu trabalho.

***Nenhum de nós é tão esperto como todos nós.***

Provérbio japonês



# ÍNDICE DE CONTEÚDOS

ÍNDICE DE CONTEÚDOS .....	I
ÍNDICE DE QUADROS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
AGRADECIMENTOS .....	IX
ABREVIATURAS .....	X
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 BREVE ANÁLISE CONJUNTURAL DA REGIÃO DE INCIDÊNCIA DO ESTUDO – ALENTEJO .....	3
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUB-SECTOR DAS FORRAGENS NO ALENTEJO.....	6
2.3 TÉCNICAS ACTUAIS DE FENAÇÃO.....	11
2.4 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS CONSERVADAS .....	16
2.4.1 FACTORES QUE AFECTAM A CARACTERIZAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS CONSERVADAS .....	18
2.4.1.1 CONDIÇÕES DE AMOSTRAGEM.....	18
2.4.1.2 LOCAL E ÂNGULO DE RECOLHA DA AMOSTRA .....	19
2.4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DO AMOSTRADOR .....	20
2.4.1.4 NUMERO DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS .....	22
2.4.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA FORRAGEM MADURA.....	23
2.4.2.1 PRIMEIRO CICLO DE CRESCIMENTO.....	23
2.4.2.2 CICLOS DE RECRESCIMENTO.....	25

2.4.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS .....	26
2.4.3.1 MÉTODOS QUÍMICOS .....	26
2.4.3.2 MÉTODOS FÍSICOS .....	34
2.4.3.3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS .....	35
2.4.3.4 MÉTODOS ENZIMÁTICOS .....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
3.1 TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM .....	44
3.1.1 MÉTODO DAS AMOSTRAS COMPÓSITAS.....	44
3.1.2 MÉTODO DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS .....	44
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	45
3.2.1 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA TOTAL.....	46
3.2.2 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA.....	47
3.2.3 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	49
3.2.4 CÁLCULO DO VALOR DA ENERGIA METABOLIZÁVEL .....	53
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 VALOR NUTRITIVO DOS FENOS ANALISADOS .....	54
4.2 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE AMOSTRAGEM MAIS CORRECTO PARA CARACTERIZAR UMA FORRAGEM.....	67
4.3 NÚMERO MÍNIMO DE FARDOS A AMOSTRAR POR EXPLORAÇÃO .....	70
5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE ACÇÕES A DESENVOLVER .....	72
5.1 CONCLUSÕES .....	72
5.2 PROPOSTAS DE ACÇÕES A DESENVOLVER.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
ANEXO I – DIRECTIVAS DA COMISSÃO EUROPEIA.....	83
ANEXO II – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE PRODUÇÃO DOS FENOS AMOSTRADOS .....	120

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Utilização das terras e a SAU (Alentejo).....	6
Quadro 2. Utilização das terras e a SAU (Portugal).....	7
Quadro 3. Evolução dos Efectivos Pecuários (Alentejo) .....	8
Quadro 4. Evolução dos Efectivos Pecuários (Portugal).....	8
Quadro 5. Indicação do melhor local de recolha da amostra para os vários tipos de fardos .....	19
Quadro 6. Comparação entre as análises de Van Soest e a celulose bruta na precisão da previsão da digestibilidade das forragens (100 X DMS ou DMO), .....	30
Quadro 7. Precisão (erro padrão da média) da previsão da digestibilidade da matéria orgânica (100x DMO), a partir de critérios parietais simples e da análise sequencial das paredes (além do teor em matérias azotadas).....	32
Quadro 8. Previsão da digestibilidade da matéria orgânica (100xDMO) pela medida da resistência à trituração (I. F. = Índice de fibrosidade). Correlação e respectivo erro padrão .....	34
Quadro 9. Comparação da precisão (erro padrão da média) da previsão da digestibilidade das forragens (100*DMO) pelos métodos físicos e microbiológicos .....	35
Quadro 10. Teores de matéria seca (MS), cinzas totais (CT), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca (D) e energia metabolizável (EM) encontrados nos fenos analisados. ....	54
Quadro 11. Teores médios de MS, MO, PB, D e EM, para os diferentes tipos de feno amostrados.....	55
Quadro 12. Valores médios, extremos, e desvio padrão dos resultados das análises das 20 amostras compósitas de fenos e respectiva significância estatística. ....	56
Quadro 13. Composição química e valor nutritivo de fenos produzidos em Espanha, França e Índia, para comparação com fenos nacionais. ....	59
Quadro 14. Proposta de uma escala de classificação de fenos (segundo Rhykerd, Almeida e Serrano 1982. Boletim de Extensão Rural nº 2, Universidade de Évora) .....	60

Quadro 15. Composição química, digestibilidade da matéria orgânica e valor energético de alguns alimentos fibrosos típicos.....	64
Quadro 16. Valores encontrados para as amostras individuais da Herdade de “Catarina Vaz”, em feno de aveia*vicia*cevada.....	68
Quadro 17. Valores encontrados para as amostras individuais da Cooperativa do Escoural, em feno de espontâneas.....	68
Quadro 18. Teores de MS, CT e PB, que resultam da média das 10 amostras individuais dos fenos amostrados, e teores encontrados nas respectivas amostras compósitas. ....	69
Quadro 19. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação, resultantes da análise de 12 fenos amostrados, segundo 2 métodos diferentes de amostragem. ....	69
Quadro 20. Variação da repetibilidade, de acordo com o número de fardos a amostrar.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Total Culturas Forrageiras Alentejo face à média do período 1989-2005 (1000ha).....	6
Figura 2.	Total Culturas Forrageiras Alentejo (ha) .....	6
Figura 3.	Total Culturas Forrageiras Portugal (ha) .....	7
Figura 4.	Total Culturas Forrageiras - Alentejo e Portugal % de SAU.....	7
Figura 5.	Evolução dos Efectivos Pecuários (Alentejo) – 1989 = 100) .....	8
Figura 6.	Evolução dos Efectivos Pecuários (Portugal) – 1989 = 100) .....	8
Figura 7.	Evolução cabeças Normais e Forragens (Alentejo) - 1989 = 100 .....	8
Figura 8.	Produção de forragens transformadas na Europa (AIFE 2005).....	10
Figura 9.	Fardos cilíndricos de grande densidade e dimensão .....	11
Figura 10.	Fardos rectangulares cilíndricos de grande densidade e dimensão.....	11
Figura 11.	Fardos cilíndricos de grade dimensão atados com fio sintético.....	13
Figura 12.	Fardos rectangulares de grade dimensão atados com fio sintético .....	13
Figura 13.	Pormenor de um fardo rectangular de grade dimensão atado com fio sintético.....	14
Figura 14.	Fardos cilíndricos de grade dimensão atado com fio sintético com forragem de regadio.....	14
Figura 15.	Fardos cilíndricos de grande dimensão com cobertura em tela de plástico ...	15
Figura 16.	Tentativa de adaptação das fases de maior carência alimentar no ciclo produtivo de ruminantes, aos períodos de maior abundância e qualidade na curva de crescimento da pastagem, para esta região .....	17
Figura 17.	Indicação do melhor local de recolha da amostra para os fardos cilíndricos de grande dimensão e para os rectangulares de pequena dimensão .....	20
Figura 18.	Relação entre a digestibilidade da matéria orgânica e a idade, para gramíneas, no decurso do 1ª ciclo vegetativo.....	24
Figura 19.	Relação entre a digestibilidade da matéria orgânica e o teor em celulose bruta para as gramíneas, no decurso do 1º ciclo vegetativo. ....	27

Figura 20.	Evolução da digestibilidade da matéria orgânica (DMO), e dos teores em matérias azotadas (PBØ) e em celulose bruta (CBØ) em g/Kg de matéria orgânica, do fléolo em função da idade ( $\bar{x}$ ), no decurso do 1º ciclo vegetativo.....	29
Figura 21.	Efeito dos diferentes métodos para determinação da lenhina na diferença entre as rectas de regressão de gramíneas e leguminosas, relacionando a digestibilidade da matéria seca com o teor de lenhina do alimento. ....	33
Figura 22.	Localização dos pontos de produção dos fenos amostrados.....	43
Figura 23.	Pormenor de incidência da zona de maior concentração de amostragem - Concelho de Évora.....	43
Figura 24.	Teores médios Globais de MS, MO, PB, D e EM, para os fenos amostrados. ....	56
Figura 25.	Distribuição das percentagens das amostras de fenos, por conteúdo em proteína bruta e energia metabolizável, em intervalos de classe ( $\bar{x}$ , média; $\sigma$ , desvio padrão; min, valor mínimo; max, valor máximo). ....	57
Figura 26.	Representação gráfica da variação da repetibilidade, de acordo com o número de fardos a amostrar.....	71

## **RESUMO**

### **Contributo para a Caracterização do Valor Nutritivo dos Fenos Produzidos no Alentejo.**

O presente trabalho actualiza e complementa um estudo realizado nos anos de 1985-1986, centrando-se os objectivos do trabalho na definição de um número mínimo de fardos a amostrar para obtenção de uma amostra representativa de fenos, na identificação da metodologia mais assertiva para amostragem de um lote de feno e na caracterização do valor nutritivo dos fenos no Alentejo. Procedeu-se a uma análise da evolução produtiva de fenos na região, ao desenvolvimento tecnológico dos sistemas de produção e aos métodos de análise laboratorial. Os fenos amostrados evidenciaram uma má qualidade quanto ao teor em Proteína Bruta (PB) e mediana quanto à Digestibilidade (D). Avaliou-se em 16 o número mínimo de fardos a amostrar por exploração. Concluiu-se ser o método das amostras compósitas o mais adequado ao objectivo pretendido. Foram comparados e discutidos à luz de trabalhos mais recentes os resultados de diversos parâmetros anteriormente encontrados.

**Palavras-chave:** Alentejo; fenos; fenação; fardos; amostragem; valor nutritivo; técnicas laboratoriais; qualidade.

# **ABSTRACT**

## **A Contribution for the Characterization of the Nutritional Value of Hays Produced in Alentejo.**

The present work updates a previous study carried out on the years 1985 to 1986 and focused on the statistical determination of a bale minimum number to be sampled for obtaining a representative hay sample, the determination of an assertive methodology for sampling and analytical characterization of hays nutritive value in Alentejo. Production trends, technological development and analytical evaluation were addressed. Sampled hays showed poor quality: their crude protein content (CP) was reduced and revealed a medium quality on digestibility. Based on the repeatability achieved for CP, 16 bales was the minimum sampling number in order to get a representative hay sample. Sampling methods were compared: the composed sampling method was shown to suit the objectives of the present studies. Several analytical parameters were compared and discussed with more recent reports.

**Key words:** Alentejo; hays; haymaking; bales; sampling; nutritive value; laboratory techniques; quality



## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a tornar este trabalho uma realidade, transmito o meu grande agradecimento.

À Professora Doutora Ofélia Pereira Bento, como orientadora deste estudo que através do seu forte conhecimento técnico, rigor, experiência de investigação e simpatia sempre me apoiou e conduziu neste trabalho.

A toda a equipa da Comissão de Curso deste Mestrado, Professora Doutora Cristina Pinheiro, Professor Doutor Amadeu Freitas, Professor Doutor Alfredo Pereira e também Professor Doutor José Martins que através de um trabalho de incentivo, acompanhamento e espírito crítico me ajudaram a concretizar este meu objectivo.

Aos meus colegas de trabalho e amigos Amável Candeias e João Alface a ajuda e inteira disponibilidade de colaboração.

Ao meu colaborador e amigo Rui Miguel Montoito, a sua disponibilidade e boa vontade sempre que lhe solicitei colaboração.

Aos meus pais pela ajuda e apoio que sempre me deram, por tudo o que me possibilitaram.

O meu reconhecimento a José Manso Preto Nobre, meu companheiro, pela ajuda, apoio e motivação que sempre me transmitiu.

Por último agradeço ao meu querido filho, Luís Alexandre Rosalino Venâncio a compreensão e respeito que manifestou pelas horas que lhe faltei.

A todos o meu muito obrigado.

## ABREVIATURAS

- “ADF” – “Acid detergent fiber” = Fibra insolúvel em detergente ácido (%)
- “ADL” – “Acid detergent lignin” = Lenhina insolúvel em detergente ácido (%)
- CT – Cinzas totais (%)
- CB – Celulose bruta (g/Kg MO)
- “CD” – “Cellulase DOMD, digestion by pepsin/hydrochloric acid followed by cellulose enzyme” = Digestibilidade da matéria orgânica na material seca determinada por digestão com pepsina/HCl seguida por celulase (%)
- DMS – Digestibilidade da matéria seca *in vitro* (%)
- DMO – Digestibilidade da matéria orgânica *in vitro* (%)
- D – Digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca *in vitro* (%)
- EM – Energia metabolizável (Mj/Kg MS)
- ED – Energia digestível
- EED – Extracto etéreo digestível (g/Kg)
- ENAD – Extractivo não azotado digestível (g/Kg)
- FB – Fibra bruta (%)
- FBD – Fibra bruta digestível (g/Kg)
- GPT – Técnica de produção de gás
- I.M.. I.P. – Instituto de Meteorologia IP Portugal
- IVGPT – Técnica de Produção de Gás *in vitro*
- MS – Matéria seca (%)
- MO – Matéria orgânica (%)
- “MADF” – “Modified acid detergent fiber” = “ADF” modificado
- MOD – Matéria orgânica digestível (g/Kg)
- “NCD” – “Cellulase DOMD, digestion in neutral detergent followed by cellulose enzyme” = Digestibilidade da material orgânica na material seca determinada por extracção com detergente neutro seguida de digestão por celulase (%)
- “NDF” – “Neutral detergent fiber” = Fibra insolúvel no detergente neutro (%)
- N – Azoto total (%)
- PB – Proteína bruta (%)
- PBD – Proteína bruta digestível (g/Kg)
- VAB – Valor Acrescentado Bruto

# 1. INTRODUÇÃO

Hoje, devido a inúmeros factores, tais como a necessidade de obter uma produtividade marginal cada vez maior, ou a pequena diferença que existe entre os custos e as receitas, o agricultor vê-se confrontado com a necessidade de recorrer a sistemas mais completos e eficientes. Para tal são necessários estudos e ensaios que permitam tirar conclusões, que introduzam melhorias na vertente económica da empresa agrícola.

Neste pressuposto, o trabalho agora realizado pretende contribuir para aquele objectivo. Constitui a sequência da caracterização do valor nutritivo dos fenos produzidos na região do Alentejo, efectuada em 1985/86 que permitiu tirar algumas conclusões acerca do que se poderia fazer para a melhoria da qualidade dos fenos do Alentejo, para a alimentação animal dos ruminantes desta região e consequentemente para a vertente económica destas actividades.

Os pequenos e grandes ruminantes (ovinos e bovinos) de aptidão creato-poiética são as espécies mais representativas destas zonas, para além do suíno que, apesar de monogástrico, faz também algum aproveitamento das pastagens. A base da alimentação destes animais são os prados, quer naturais quer semeados; no entanto, devido a condicionalismos climáticos, o crescimento da erva ao longo do ano é muito irregular. O pico máximo do crescimento situa-se na Primavera, existindo um período nulo na época de Verão e um crescimento baixo durante o Inverno. Quanto ao Outono, se for húmido, poderá permitir um crescimento moderado, mas se este for seco tal não se verificará (Crespo, 1975). Existem pois períodos de carência alimentar, aos quais há que fazer face. Poder-se-ia recorrer nestes períodos de carência a arraçoamentos à base de concentrados, mas o seu preço é inabastante para qualquer exploração pecuária, havendo então que recorrer a alimentos que tenham custos mais reduzidos, mas cujo valor alimentar permita em associação com algum alimento concentrado, fazer face às necessidades de manutenção e produção do animal. As necessidades nutritivas destes animais variam também em função do seu estado fisiológico; daí que exista uma necessidade de ajustar as fases do seu ciclo produtivo em que as necessidades são máximas, aos períodos de maior abundância de pascigo, tanto em produção como em qualidade, evitando, deste modo, o recurso aos concentrados e às forragens conservadas, por períodos muito longos. (Vide figura 16).

Seja qual for o sistema utilizado, ressalta-nos o quanto é importante que essas forragens conservadas tenham um bom valor alimentar. Em função da importância que as forragens conservadas (das quais o feno é a mais utilizada entre nós) têm, nos sistemas alimentares mais praticados nesta região, continua a parecer-nos importante e urgente a execução de um plano de utilização/comercialização de fenos, com base em tabelas classificativas dos mesmos. Para que tal plano possa ser posto em prática haverá que sensibilizar o produtor para a necessidade de produzir bons fenos. Desta forma, um feno que manifeste na sua composição uma percentagem superior de proteína bruta e energia, relativamente a um outro cujo teor seja menor, deverá ser economicamente mais lucrativo (Almeida, 1982a). Só desta forma se levará o agricultor a cortar a sua forragem segundo o aspecto qualitativo (digestibilidade e proteína – épocas de corte mais precoces), sacrificando ligeiramente o aspecto quantitativo.

Para uma primeira tentativa de previsão do valor nutritivo dos fenos, foi iniciado na campanha 1984/85 (início em Maio), com o auxílio da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo (Divisão de Produção Animal), um trabalho de caracterização do valor nutritivo de fenos produzidos em diferentes explorações do Alentejo (*Vide* figuras 22 e 23).

Esse trabalho teve como grandes objectivos:

1. Determinar qual dos dois métodos de amostragem praticados seria o mais correcto para caracterizar o valor nutritivo médio do feno numa exploração.
2. Determinar qual o número mínimo de fardos a amostrar por exploração.
3. Avaliação do valor nutritivo dos fenos da região do Alentejo.

O trabalho agora apresentado tem como base o estudo da caracterização do valor nutritivo dos fenos produzidos no Alentejo, que foi desenvolvido nos anos de 1985/86. Procurou-se agora, passados 25 anos, efectuar a avaliação deste subsector da exploração agrícola, sob o ponto de vista da sua evolução produtiva e desenvolvimento tecnológico.

Foi efectuada uma revisão bibliográfica sobre estas mesmas matérias, com vista a actualizar o tema e observar quais os progressos ocorridos entre os anos de 1985 e 2010.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

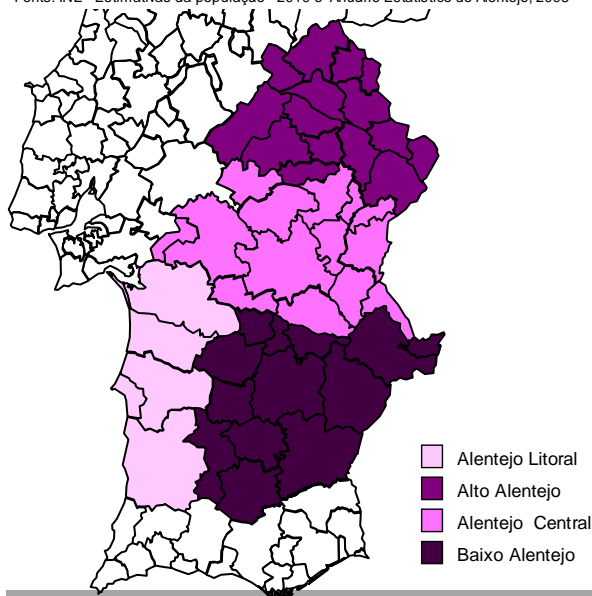
### 2.1 BREVE ANÁLISE CONJUNTURAL DA REGIÃO DE INCIDÊNCIA DO ESTUDO – ALENTEJO



Território, População e Estrutura Territorial

NTUS	Área	População 2009	Densidade Populacional Hab/Km2
Alentejo	27.276,2	503.507	18,5
Alentejo Litoral	5.255,8	94.904	18,1
Alto Alentejo	6.248,9	115.421	18,5
Alentejo Central	7.228,8	168.116	23,3
Baixo Alentejo	8.542,7	125.066	14,6

Fonte: INE - Estimativas da população - 2010 e Anuário Estatístico do Alentejo, 2008



#### Potencialidades Estratégicas\*

**Identidade cultural e paisagem**  
**Sistemas culturais mediterrâneos**  
**Recursos hídricos e EFMA,**  
**Valor natural do litoral e zona costeira,**  
**Cidades equipadas e seguras e qualidade dos centros históricos,**  
**Transportes.**  
**Estrutura do povoamento urbano indutora de uma sustentabilidade ambiental,**  
**Recursos extractivos**  
**Recursos energéticos endógenos**  
**Posicionamento geográfico e acessibilidades**

#### Factores de Estrangulamento\*

**Erosão do solo e desertificação,**  
**Dimensão e estrutura demográfica,**  
**População activa,**  
**Dimensão produtiva da região,**  
**Rede Viária e Serviços de Transportes**

#### Desafios\*

**Crescimento económico e emprego**  
**Demografia, população e recursos humanos**  
**Reforço dos principais Centros Urbanos e nova relação urbano-rural**  
**Criar escala e reforçar as relações com o exterior**  
**Implementar um modelo de turismo sustentável**  
**Garantir adequados níveis de coesão territorial interna**  
**Preservar e valorizar o património natural e cultural**  
**Potenciar as grandes infra-estruturas**  
**Combater os processos de desertificação**

\* Análise prospectiva extraída do Plano Regional de Ordenamento do Território do Alentejo (PROTA)

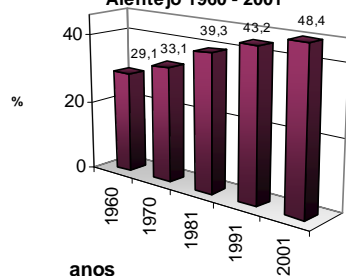
## TERRITÓRIO E POPULAÇÃO

O Alentejo é a maior região de Portugal, ocupando uma área de 27 332,4 km<sup>2</sup>, na qual residem 503 507 habitantes distribuídos por 4 sub-regiões: Alentejo Litoral com 94 904, Alto Alentejo com 115 421, Alentejo Central com 168 116 e Baixo Alentejo com 125 066 habitantes.

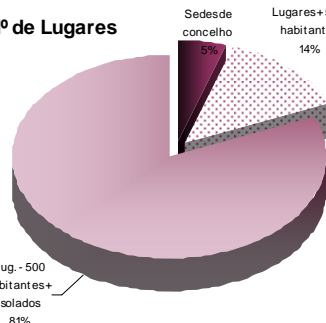
É a região portuguesa de menor densidade populacional, com valores ligeiramente inferiores aos 19 hab/km<sup>2</sup>, enquanto que a média nacional se situa nos 115 hab/km<sup>2</sup>.

No Alentejo, o povoamento configura-se numa estrutura cada vez mais de tipo concentrado, com reforço continuado da importância da população que reside nos lugares de maiores dimensões ou nas sedes de concelho ou de distrito, em detrimento dos lugares de menor dimensão ou importância, que têm vindo a assistir a uma diminuição continuada do seu efectivo demográfico, com o consequente despovoamento das zonas rurais.

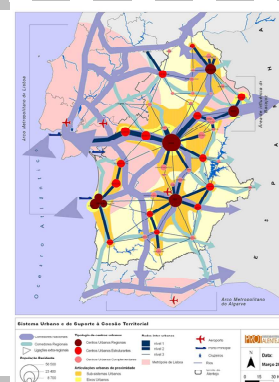
População nas Sedes de Concelho - Alentejo 1960 - 2001



Nº de Lugares



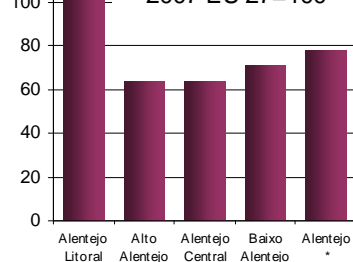
Rede Urbana



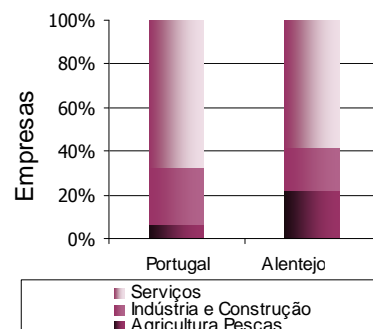
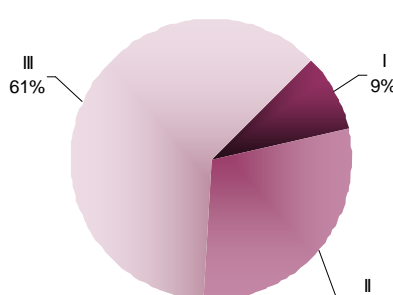
## COMPETITIVIDADE REGIONAL

O contributo do Alentejo para a produção de riqueza em 2008, data da última informação disponível, representava, 5% do PIB português. O indicador PIB per capita, com o valor de 14,7 mil €, revela um posicionamento globalmente desfavorável da região, abaixo da média nacional, que registava um valor de 15,7 mil € (disparidade do PIB per capita com Portugal =100 no Alentejo em 2007 era de 93,6). A estrutura empresarial do Alentejo é caracterizada, genericamente, pela reduzida dimensão empregadora, com uma média de 96% de empresas com menos de 9 trabalhadores.

PIB per capita ppc 2007 EU 27=100



Estrutura Sectorial do VAB



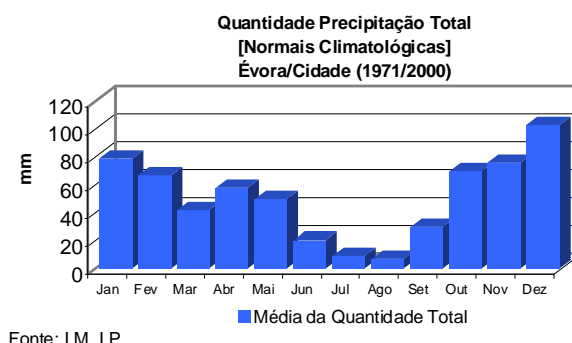
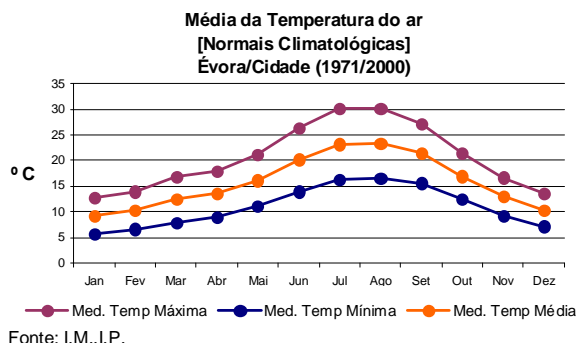
## ACTIVIDADES AGRÍCOLAS E AGRO-INDUSTRIA

As actividades primárias agro-florestais (agricultura e silvicultura) moldam o aproveitamento, conservação e transformação do solo, da vegetação e da paisagem rural, ocupando mais de 95% do território do Alentejo e constituindo, assim, o principal esteio da sua identidade e sustentabilidade ambiental.

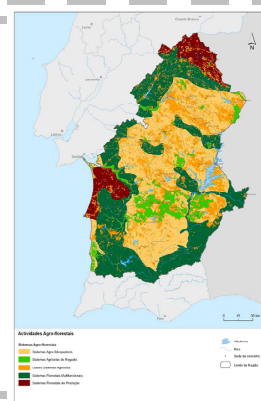
O aumento das áreas irrigáveis em articulação com a reorientação produtiva induzida pelas diversas políticas com incidência directa no sector agrícola pode potenciar o desenvolvimento das culturas tradicionais praticadas no regadio como por exemplo: as forragens, o milho, os cereais e o girassol, ou a introdução de novas culturas. Desta forma ajustar-se-á a produção ao mercado e à procura cada vez maior deste tipo de culturas, destinadas à alimentação animal, alimentação humana ou à produção de biocombustíveis (biodiesel e bietanol).

A economia regional integra um conjunto de actividades tradicionais provenientes da exploração e transformação de vários recursos endógenos, como a agricultura, a pesca, a agro-indústria e a indústria extractiva, que são susceptíveis de melhorar os seus níveis de competitividade e desta forma, aumentar o seu contributo para a produção regional.

A agricultura, a pecuária e a floresta têm um papel relevante nas cadeias de valor da região, porque apresentam características singulares e caracterizam-se pela obtenção de matérias-primas de qualidade, contribuindo decisivamente para a existência de uma agro-indústria com grande tradição na transformação de produtos agrícolas e pecuários e na obtenção de produtos com elevada qualidade, boa imagem de marca e grandes potencialidades de afirmação em vários segmentos do mercado nacional e internacional, nomeadamente carnes, queijos, enchidos, pão, doces, mel, vinho, uva de mesa e azeite. (Texto retirado da Resolução do Conselho de Ministros nº 53/2010, Diário da Republica, 1ª serie \_ Nº 148 de 2 de Agosto, Aprovação do Plano Regional de Ordenamento do Território do Alentejo (PROTA))

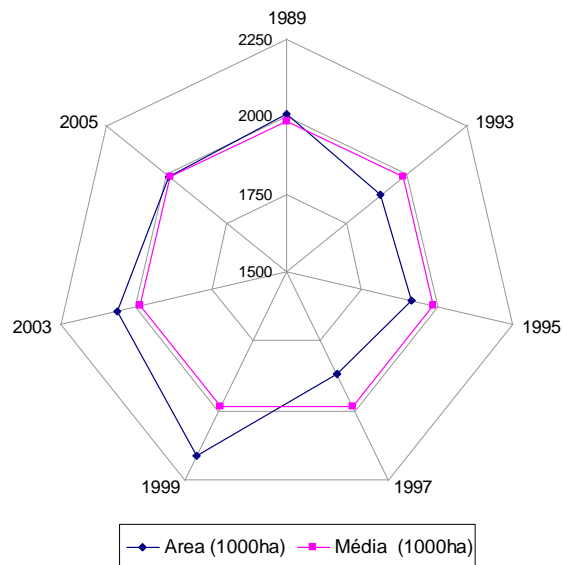


### Actividades Agrícolas



## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUB-SECTOR DAS FORRAGENS NO ALENTEJO

A abordagem destas matérias exige que o conhecimento sobre o seu enquadramento, seja necessário e tão actual quanto possível. É motivada pela identificação de problemas que decorrem de observações e análises efectuadas a dados e indicadores recolhidos do meio em que se insere o estudo. Assim a análise dos dados referentes ao Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas para o período 1989-2005 teve como objectivo perceber a evolução das áreas ocupadas com forragens, a evolução dos efectivos pecuários e o seu ajustamento de modo a verificar se estas permitem a cobertura das necessidades alimentares daqueles animais.



Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999

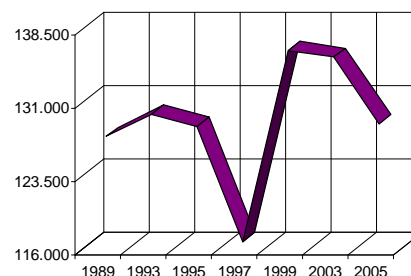
**Figura 1. Total Culturas Forrageiras Alentejo face à média do período 1989-2005 (1000ha)**

Esta abordagem constituiu uma primeira contribuição para a caracterização do sub-sector das forragens no Alentejo.

**Quadro 1. Utilização das terras e a SAU (Alentejo)**

ANO	Superfície Total Área (ha)	Total de SAU		Total Culturas Temporárias		Total Culturas Forrageiras	
		Área (ha)	Sup. Total %	Área (ha)	SAU %	Área	SAU %
1989	2.007.275	1.842.097	91,8	660.940	35,9	127.416	6,9
1993	1.889.172	1.766.677	93,5	513.671	29,1	129.735	7,3
1995	1.913.756	1.800.536	94,1	515.530	28,6	128.454	7,1
1997	1.867.929	1.757.360	94,1	505.516	28,8	116.645	6,6
1999	2.158.884	1.924.044	89,1	564.222	29,3	136.252	7,1
2003	2.061.579	1.836.215	89,1	469.727	25,6	135.549	7,4
2005	1.987.524	1.792.285	90,2	378.685	21,1	128.712	7,2

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.

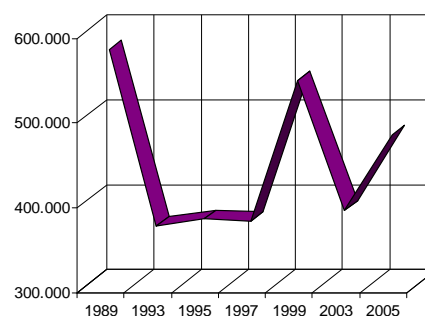


**Figura 2. Total Culturas Forrageiras Alentejo (ha)**



**Quadro 2. Utilização das terras e a SAU (Portugal)**

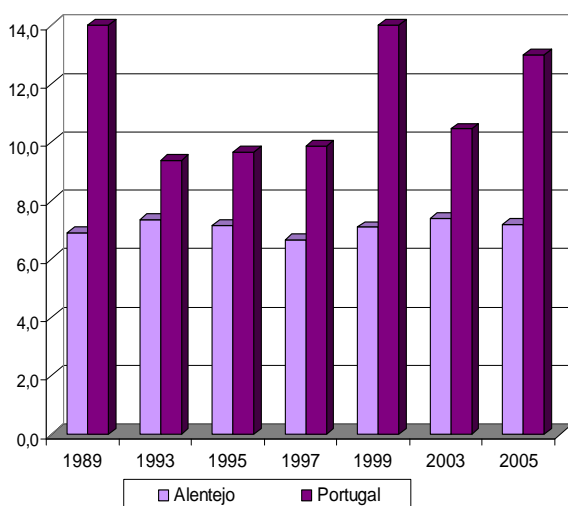
ANO	Superfície Total Área (ha)	Total de SAU		Total Culturas Temporárias		Total Culturas Forrageiras	
		Área (ha)	Sup. Total %	Área (ha)	% SAU	Área	% SAU
1989	5.316.161	4.005.594	75,3	1.895.364	47,3	578.489	14,4
1993	5.158.221	3.949.548	76,6	1.351.629	34,2	370.990	9,4
1995	5.084.776	3.924.623	77,2	1.316.113	33,5	378.462	9,6
1997	4.949.396	3.822.127	77,2	1.237.266	32,4	376.796	9,9
1999	5.188.955	3.863.116	74,4	1.399.372	36,2	542.131	14,0
2003	4.888.500	3.725.190	76,2	1.010.300	27,1	389.379	10,5
2005	4.779.428	3.679.587	77,0	1.008.690	27,4	478.095	13,0

**Figura 3. Total Culturas Forrageiras Portugal (ha)**

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.

### Conclusões

Não se verifica uma evolução muito significativa nas áreas ocupadas por forragens na Superfície Agrícola Útil<sup>1</sup> do Alentejo ao longo da série de anos apresentada. Verifica-se que ocorreu entre o ano de 1995 e 1997 uma quebra e uma tendência positiva no período entre 1997 e 1999. Para o período seguinte as áreas ocupadas mantêm-se mais elevadas que nos primeiros anos da série mas sem oscilações muito significativas. Relativamente ao País o Alentejo mantém uma tendência muito semelhante embora com um desfazamento temporal. A evolução da área de culturas forrageiras<sup>2</sup> acompanhou a evolução da área de culturas temporárias<sup>3</sup>. O seu ponto máximo verificou-se em 1989, variando as áreas de forma irregular ao longo da série, deixando antever uma tendência para um acréscimo das áreas nos últimos anos analisados.

**Figura 4. Total Culturas Forrageiras - Alentejo e Portugal % de SAU**

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.

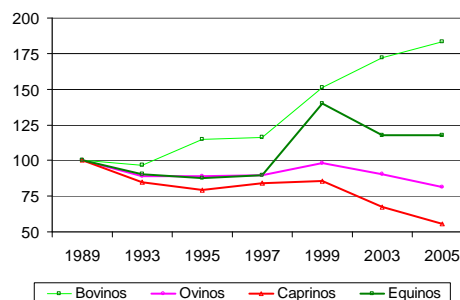
<sup>1</sup> Superfície da exploração que inclui: terras aráveis (limpa e sob-coberto de matas e florestas), horta familiar, culturas permanentes e pastagens permanentes

<sup>2</sup> Culturas destinadas ao corte para dar ao gado e que são colhidas antes de completarem o seu ciclo vegetativo (maturação), de modo a serem melhor digeridas pelos animais. Podem ser consumidas pelo gado em verde, depois de conservadas como feno ou silagem ou secas ao Sol ou desidratadas artificialmente.

<sup>3</sup> Culturas cujo ciclo vegetativo não excede um ano (as anuais) e também as que são ressemeadas com intervalos que não excedem cinco anos (morangos, espargos, prados temporários, etc.).

**Quadro 3. Evolução dos Effectivos Pecuários (Alentejo)**

ANO	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Equinos
	Nº	Nº	Nº	Nº
1989	258.984	1.505.314	140.605	6.421
1993	251.281	1.342.324	119.801	5.795
1995	297.970	1.338.120	111.669	5.640
1997	300.672	1.346.862	118.060	5.755
1999	392.268	1.476.342	119.949	9.002
2003	445.808	1.363.863	95.232	7.535
2005	474.663	1.225.826	78.373	7.539

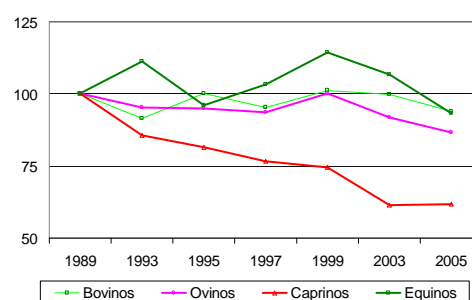


**Figura 5. Evolução dos Effectivos Pecuários (Alentejo) – 1989 = 100**

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.

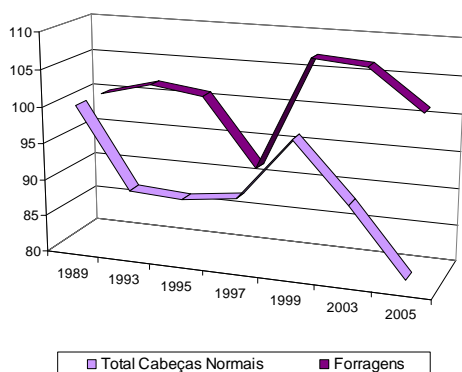
**Quadro 4. Evolução dos Effectivos Pecuários (Portugal)**

ANO	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Equinos
	Nº	Nº	Nº	Nº
1989	1.401.206	2.926.278	720.522	36.246
1993	1.282.945	2.785.924	616.347	40.276
1995	1.405.013	2.779.940	585.844	34.769
1997	1.335.736	2.737.097	551.292	37.412
1999	1.415.188	2.929.765	537.241	41.469
2003	1.398.176	2.684.588	442.026	38.663
2005	1.315.438	2.532.871	443.730	33.781



**Figura 6. Evolução dos Effectivos Pecuários (Portugal) – 1989 = 100**

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.



**Figura 7. Evolução cabeças Normais e Forragens (Alentejo) - 1989 = 100**

Fonte: INE - Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 1993, 1995, 1997, 2003 e 2005; Recenseamento Geral Agrícola, 1989 e 1999.

## Conclusões

Para o período entre 1989 e 1997 observa-se uma tendência divergente entre necessidades alimentares e disponibilidades de origem forrageira produzidas no Alentejo.

A partir do ano de 1997 verifica-se uma tendência de evolução semelhante face às necessidades alimentares representado pelo número de Cabeças Normais existentes *versus* as disponibilidades alimentares traduzidas através das áreas ocupadas por forragens na Superfície Agrícola Útil, na região.

Seria mais elucidativo se o presente trabalho pudesse ser apresentado com base em valores relativos a forragens conservadas, contudo essa informação não se encontra apurada por parte do Instituto Nacional de Estatísticas.

Foi efectuado um esforço de pesquisa noutras fontes de informação como sejam os registos de produção de forragens secas, relativo ao sistema de “Apoio à Produção de Forragens Secas” da responsabilidade do Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, porém este registo diz apenas respeito às produções que foram motivo de candidatura a este apoio. Os valores encontrados não são representativos da produção de feno no Alentejo, pois apenas apresentam a produção de um pequeníssimo número de agricultores que produzem feno nesta região.

A procura efectuada revelou que existe ao nível do Ministério da Agricultura Português uma preocupação no sentido de contemplar este subsector com apoios traduzindo assim a importância de que o mesmo se reveste para as políticas agrícolas. No entanto, pela prospecção realizada, ficou claro que a produção que é submetida a apoio é muito inferior à que realmente poderia beneficiar desta linha de ajudas financeiras. Ao ler o regulamento da medida, observamos que é bastante complexo, e de difícil interpretação. A sua divulgação junto dos eventuais interessados poderá não ter sido eficaz.

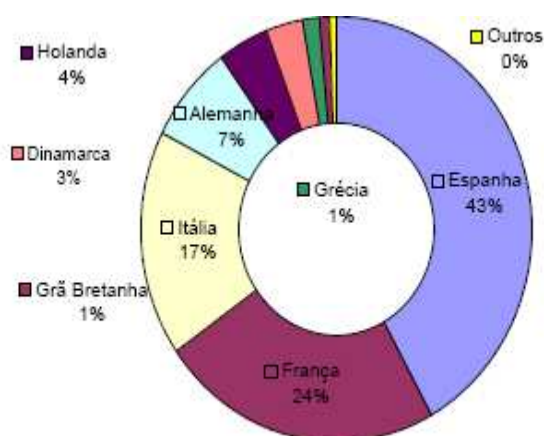
Este programa do Ministério decorre dos apoios comunitários no âmbito do Programa de Desenvolvimento Rural (PRODER), ajudas FEAGA e o direito à ajuda depende da qualidade e do tipo de desidratação sofrida pela forragem. A percentagem de Humidade, o teor mínimo de Proteína Bruta Total, expressa em relação à matéria seca e o tipo de desidratação (ao sol ou forçada), são factores com relevo para o apoio a atribuir.

Estas ajudas são reguladas através do conteúdo da Directiva da Comissão (76/371/EEC) que fixa as formas de recolha comunitárias de amostras para o controlo oficial dos alimentos para animais, a Segunda Directiva da Comissão (71/393/EEC), que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais e a Terceira Directiva da Comissão (72/199/EEC) que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo dos alimentos para animais.

Pela análise dos números relativos ao efectivo pecuário existente na região, apresentados no Quadro nº 3, para o ano 2005 (últimos números oficiais disponíveis), bem como pela observação das áreas ocupadas com culturas forrageiras, fica-nos a ideia de que os apoios financeiros ao nível do incremento das disponibilidades alimentares

para gado, se manifestam necessários tornando o sistema integrado de produção em extensivo, (o mais frequente e desejável em termos ambientais no Alentejo), mais eficiente, pois permitiria uma redução de custos no sistema alimentar, bem como um aproveitamento mais adequado do uso do solo. Parece contudo que deverão estes apoios surgir com uma maior adaptação às realidades de cada país a fim de proporcionar motivação para um nível de adesão significativo.

Através do gráfico seguinte observa-se que na Europa o principal país produtor de forragens é a Espanha com 43% seguida da França com 24%. Neste contexto, a produção em Portugal não apresenta expressão e encontra-se incluída na produção de “outros” em que o valor é de 0%. O peso apresentado da representatividade da produção portuguesa poderá fazer compreender a fraca adaptação das regras comunitárias a Portugal, no que se refere a este subsector.



Fonte: Avaliação de variedades de luzerna (*Medicago sativa* L.) em condições de regadio do Alqueva (Amante *et al.*, 2005)

**Figura 8. Produção de forragens transformadas na Europa (AIFE 2005)**

## 2.3 TÉCNICAS ACTUAIS DE FENAÇÃO

Foram essencialmente seis as mudanças tecnológicas ocorridas na fenação desde 1985 até 2010 na Região do Alentejo:

- O tipo de forragem para ferrar.
- A dimensão e versatilidade das máquinas utilizadas
- A forma do fardo
- A dimensão do fardo
- O tipo de material para atar ou sujeitar o fardo
- O tipo de acondicionamento do fardo

No Alentejo, a tecnologia da fenação sofreu algumas alterações significativas ao longo dos últimos 25 anos (1985-2010), sobretudo no que respeita ao modo de apresentação e acondicionamento (forma e dimensões) do produto final – o fardo.



**Figura 9. Fardos cilíndricos de grande densidade e dimensão**



**Figura 10. Fardos rectangulares cilíndricos de grande densidade e dimensão**

No período em que decorreu o anterior trabalho, observou-se que a forragem destinada à fenação era essencialmente forragem em que predominavam as consociações de (aveia\* vicia) e (aveia\* tremocilha), bem como a forragem de ervas espontâneas, em que algumas zonas do Alentejo são particularmente ricas.

Na última década a intensificação da divulgação das técnicas de regadio (criação do Centro Operativo e de Tecnologia de Regadio – COTR, em 1999) associada à entrada em funcionamento do Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva, juntamente com as maiores produtividades alcançadas nas culturas regadas, foram razões que motivaram os agricultores alentejanos a investir nesta prática agrícola e as forragens não foram excepção. Surgiu essencialmente o feno de azevem e de luzerna, forragens que até esta data eram muito pouco cultivadas no Alentejo.

Verificaram-se igualmente alterações ao nível da mecanização. Hoje as máquinas são mais especializadas, mais eficientes e de superior dimensão e capacidade. Segundo Serrano (2002) as evoluções ocorridas neste âmbito, surgiram “no sentido de um novo conceito de enfardagem por enrolamento e no sentido de fardos de maiores dimensões”. O mesmo autor refere que a principal alteração de mecanização se deu na fase correspondente aos trabalhos de recolha. Esta operação que até aqui era essencialmente feita à custa de braços e por isso de mão-de-obra, passou a ser efectuada com o auxílio de máquinas que possuem mecanismos de recolha e elevação elaborados que tornam todo o processo muito mais rápido e económico pois reduz substancialmente as necessidades de mão-de-obra. Esta maior facilidade de manuseamento induziu o agricultor a fabricar fardos de dimensões e densidades bastante superiores ao que era usual. O modelo de fardos cilíndricos de grande dimensão manifestava em 2002 tendência para ocupar a preferência dos produtores de feno devido à evolução tecnológica assentar numa economia de custos e uma maior versatilidade e funcionalidade da maquinaria (Serrano, 2002). O formato de fardo pequeno continua a ser utilizado, contudo surge essencialmente na propriedade de menor dimensão, devido a uma razão de economia de escala. Foi possível em 2010 confirmar a perspectiva de Serrano (2002), dado que nos campos observados aleatoriamente apenas encontramos fardos do tipo cilíndrico de grandes dimensões ou rectangulares, igualmente de grande dimensão e densidade. As fotografias que se apresentam em seguida, foram efectuadas em Junho e Julho de 2010. São observadas várias situações de enfardagem por enrolamento bem como situações em que o formato é do tipo rectangular de grande dimensão.





**Figura 11. Fardos cilíndricos de grade dimensão atados com fio sintético**



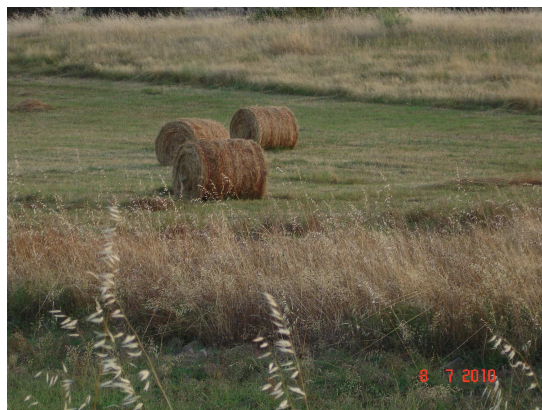
**Figura 12. Fardos rectangulares de grade dimensão atados com fio sintético**

No âmbito deste trabalho seria de enorme utilidade a apresentação de dados estatísticos sobre o número de produtores de feno que utilizam as diferentes tecnologias e as razões associadas a cada uma das opções tomadas, contudo o Instituto Nacional de Estatística (INE) não possui a informação necessária. A base de dados em causa apenas seria possível através de um inquérito dirigido pelo que se lança aqui o repto para um trabalho futuro nesta área.

As alterações de tecnologia verificadas nas operações de fenação ao longo destas duas décadas foram para além das relativas aos tipos de formato e dimensão dos fardos, a substituição do arame por cordel de junça e actualmente na maior parte dos casos por fio sintético ou mesmo rede plástica, tal como refere Serrano (2002). Contribuiu para esta mudança a necessidade de obviar muitas situações que com frequência surgiam quando o animal ingeria fragmentos de arame causando fortes problemas. Mais uma vez também a vertente dos custos pesou aqui como factor indutor de mudança.



**Figura 13. Pormenor de um fardo rectangular de grade dimensão atado com fio sintético**



**Figura 14. Fardos cilíndricos de grade dimensão atado com fio sintético com forragem de regadio**

A tradição nesta região no que diz respeito ao acondicionamento dos fardos era até muito recentemente, a mobilização do fardo para uma zona próxima da casa de habitação do agricultor, agrupados em medas e cobertos por tela de plástico ou recolhidos em hangares. A inovação surge hoje em casos em que o fardo permanece no campo mas aquando do enfardamento este é de imediato sujeito e protegido com cobertura de plástico. Esta técnica mais recente, veio contribuir para uma minimização das perdas originadas pelo efeito das chuvas que, através da formação de bolores ou fungos conferem à forragem cheiros e sabores que levam à rejeição do feno por parte dos animais. Muitos autores referem que as perdas deste tipo são particularmente importantes, quer sobre o ponto de vista da qualidade da forragem, quer sobre o ponto de vista da economia da exploração agro-pecuária. Serrano, (2002), refere que as perdas em secagens no campo, não deverão ir para além dos 3% da MS, contudo por diversas razões induzidas pela presença de humidade, as perdas podem atingir valores de 100%.

Pinheiro e Peça (2004) referem que o processo de secagem da forragem é influenciado por vários factores relacionados com a cultura, condições ambientais e com os tratamentos da colheita. As vantagens ou desvantagens do acondicionamento da forragem, a enfardação e a influência de parâmetros meteorológicos têm assentado sobretudo em pressupostos teóricos. Foram comparadas datas de corte, diferentes equipamentos de corte e varias sequências de tratamentos e comparados os seus efeitos na redução da humidade da forragem durante o processo tecnológico da fenação. Foram desenvolvidos modelos para determinar a influência do tempo e de factores operacionais com maior influência no processo de secagem no campo de todo o cordão



de forragem composto por aveias, ervilhacas e outras espécies. Entre os factores operacionais, o efeito do condicionamento foi sempre o mais importante. A enfardação 24 horas após o corte teve uma influência positiva na perda de água enquanto que a enfardação 48 horas após o corte aumentou a re-humidificação da forragem durante a noite. As variáveis atmosféricas, tais como a humidade do ar, em “deficit” de vapor de água, velocidade do vento e radiação solar foram as variáveis atmosféricas que tiveram a maior influencia no processo de secagem. A densidade do cordão deixado através do corte parece ter apenas um efeito muito reduzido no processo de secagem. Na equação desenvolvida para antever o processo de secagem dos componentes do cordão, a taxa de secagem das espécies em estudo foi influenciada pelas taxas de secagem das outras espécies que a compunham. A secagem da aveia foi influenciada pela secagem da ervilhaca e de outras espécies, e vice-versa. O condicionamento foi também um importante factor que influenciou a secagem de vários componentes, entre os quais as aveias.



**Figura 15. Fardos cilíndricos de grande dimensão com cobertura em tela de plástico**

## **2.4 IMPORTÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS CONSERVADAS**

A conservação de forragens pode sustentar-se em diversas técnicas contudo a fenação e a ensilagem são as mais utilizadas entre nós. A fenação é uma técnica de conservação de forragens, através da desidratação parcial da massa. Tem como objectivo preservar um alimento de bom valor nutritivo, com o mínimo de perdas de produção. Deve ser vista, como uma boa opção para o aproveitamento do excesso de alimentos produzidos quer através do cultivo quer de origem espontânea, no final da Primavera.

Atendendo a que existem longos períodos de carência alimentar é assim necessário que se produza e conserve de forma a fazer face a esses períodos de produção quase nula.

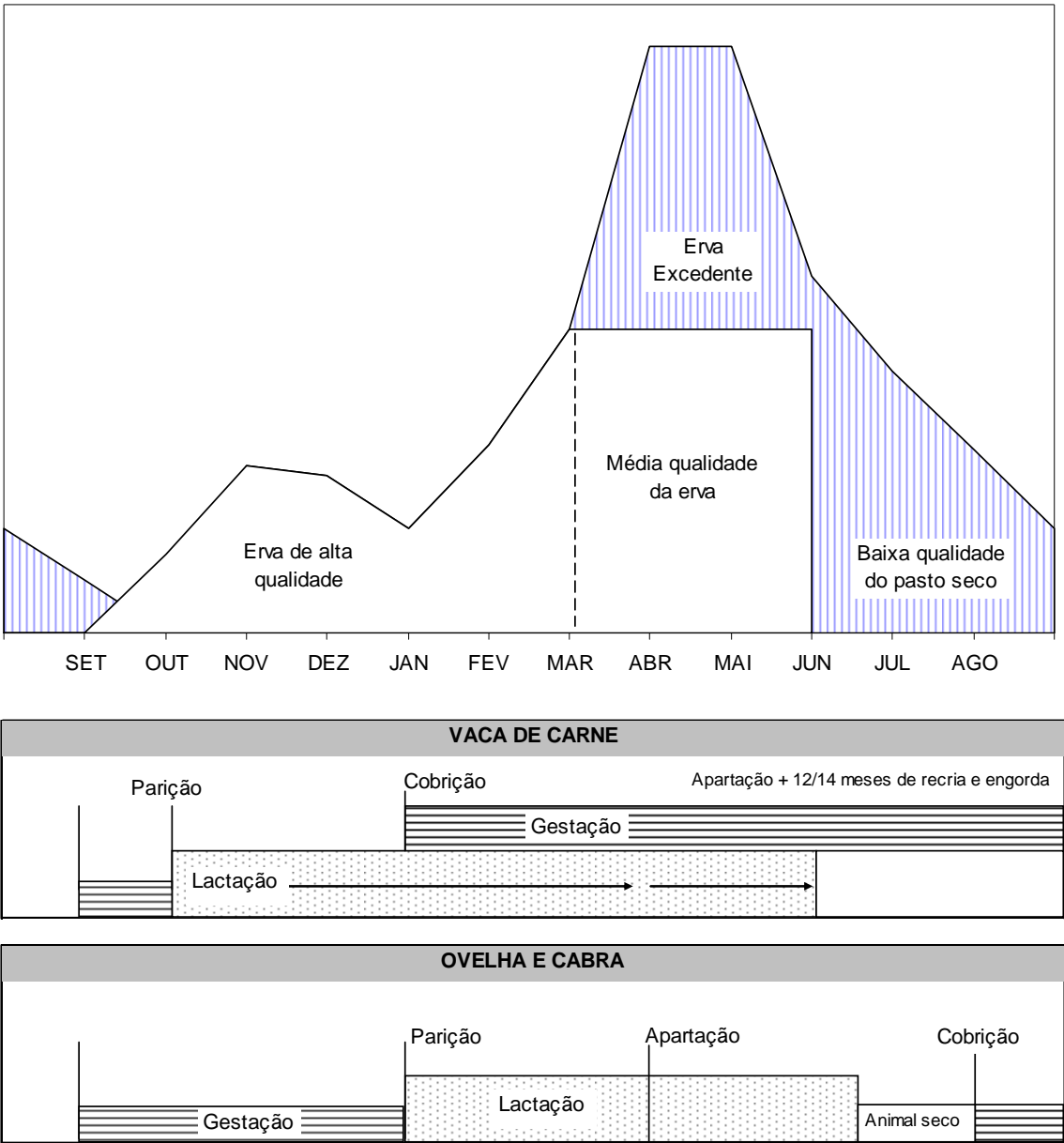
Hoje em dia com a utilização mais divulgada das produções em regadio, os períodos de carência podem ser largamente encurtados, no entanto, essencialmente durante parte do inverno, as carências são efectivas e a suplementação animal à base de forragens conservadas são uma necessidade real. Segundo Amante *et al.* (2005), Portugal apresenta uma orientação pecuária na exploração das suas terras agrícolas pelo que o estudo das culturas forrageiras se apresenta muito importante. Os mesmos autores referem ainda que o aumento da área agrícola induzido pelo regadio do Alqueva e a possibilidade de parte dessa área poder ser ocupada através de culturas forrageiras, nomeadamente luzerna para feno ou silagem, justifica a necessidade de estudos mais actuais nestas matérias.

Hoje em dia o agricultor sabe qual a importância dos arrazoamentos no rendimento das suas explorações pecuárias. Sabe que deve preocupar-se em adequá-los ao nível produtivo desejado, ao tipo de animal, bem como ao seu estado fisiológico (gestação e lactação). A figura 16 ajuda a compreender melhor esta ideia, elucidando sobre os períodos, em que nesta região, se torna mais premente a necessidade de suplementar a alimentação de ruminantes em pastoreio. A boa gestão alimentar pode ser o factor de sucesso na empresa de produção pecuária. É assim importante que seja conhecido o valor nutritivo do alimento.

No caso do feno, a vantagem do conhecimento do seu valor nutritivo pode ter um duplo interesse. Para quem o produz e comercializa bem como para quem o compra, o

conhecimento do valor nutritivo do produto em causa originará a possibilidade do produto poder adquirir diferentes valorizações consoante o seu nível de qualidade.

Um feno mais rico em valores proteicos e energéticos deverá ser comercializado a um preço superior, relativamente a um feno de índices inferiores nestes mesmos parâmetros.



Fonte: Carvalho, 1984

**Figura 16.** Tentativa de adaptação das fases de maior carência alimentar no ciclo produtivo de ruminantes, aos períodos de maior abundância e qualidade na curva de crescimento da pastagem, para esta região

## **2.4.1 FACTORES QUE AFECTAM A CARACTERIZAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS CONSERVADAS**

### **2.4.1.1 CONDIÇÕES DE AMOSTRAGEM**

A chave para uma boa análise de forragem é conseguir uma boa amostra, pretendendo-se que seja representativa da forragem produzida em determinado local (Undersander *et al.*, 2005). O trabalho de amostragem pode comprometer o resultado final no cálculo do valor nutritivo de uma forragem caso a mesma não seja efectuada com regras predefinidas. O trabalho de Pinheiro e Peça (2004) ajuda a compreender que será necessário definir os lotes de feno e recolher amostras representativas que contemplem as variações ocorridas durante a secagem e nos trabalhos de corte.

É necessário ter em conta os diversos factores que podem originar variabilidade qualitativa como sejam a maior ou menor quantidade de folhas *versus* caules, a relação gramínea / leguminosa se for o caso de uma forragem consociada, o teor de infestantes, odores, presença de fungos ou não, cor e condições climatéricas a que está exposta a forragem (presença ou não de chuva), (Undersander *et al.*, 2005). Para a definição de uma amostragem mais eficaz deverá ser possível efectuar o acompanhamento das várias fases da fenação que medeiam entre o período de corte e a amostragem propriamente dita. Um conhecimento “in loco” das condições em que ocorre todo o processo bem como da actuação dos diversos factores (tecnologia de corte da forragem, condições climatéricas e datas de corte), poderão conduzir a um melhor delineamento de amostragem.

#### 2.4.1.2 LOCAL E ÂNGULO DE RECOLHA DA AMOSTRA

Após definição e respectiva identificação dos lotes dever-se-á determinar o número de amostras a realizar. Undersander *et al.* (2005), referem que o local de amostragem pode variar com o tipo de fardos existentes, paralelepípedicos de grandes ou pequenas dimensões ou ainda redondos de grandes dimensões. Deve ter-se em conta a altura e espessura de uma das faces do fardo. O fardo não é uniforme quanto à distribuição de folhas, caules e sementes. Todo o processo de fenação influencia a composição do fardo. O tamanho e forma do fardo também podem alterar a homogeneidade compósita do feno. Assim, é importante realizar uma boa observação visual a fim de avaliar o grau de homogeneidade em cada lote. Muitas vezes uma boa observação da forragem após a enfardação e o respectivo registo da mesma, poderá constituir um bom auxiliar em laboratório na determinação da qualidade e valor nutritivo desse feno. O Quadro nº 5 apresenta segundo aqueles autores a localização adequada para a recolha da amostra para cada uma das tipologias de fardos.

Quadro 5. Indicação do melhor local de recolha da amostra para os vários tipos de fardos

TIPO DE FARDO	DISTRIBUIÇÃO DE FOLHAS E CAULES	MELHOR LOCAL PARA AMOSTRAGEM
FARDOS RECTANGULARES PEQUENOS	As folhas concentram-se nos lados longitudinais dos fardos (faces mais apertadas)	Tirar uma amostra do centro através de cada extremidade
FARDOS RECTANGULARES GRANDES	Uniforme ao longo da extremidade mas pode variar na espessura	Tirar uma amostra do centro a partir de qualquer sítio. Inserir o amostrador em ângulo de 45° se for de lado ou em ângulo de 90° se for de topo.
FARDOS CILÍNDRICOS	Uniforme no diâmetro	Tirar uma amostra do lado curvo do fardo, com o amostrador situado na perpendicular relativamente à superfície. Se a superfície estiver contaminada deve remover-se a camada externa antes de amostrar.

Fonte: Undersander *et al.* (2005).



**Figura 17.** Indicação do melhor local de recolha da amostra para os fardos cilíndricos de grande dimensão e para os rectangulares de pequena dimensão

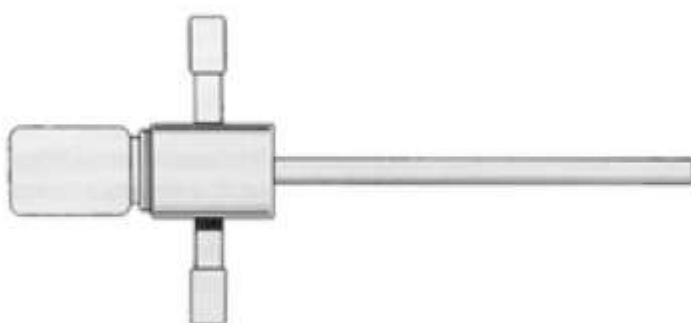
### **2.4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DO AMOSTRADOR**

Devem utilizar-se amostradores que permitam recolher feno do interior do fardo pois essa prática reduz o erro. Um folheto de divulgação publicado pela Oklahoma State University, (1994) refere que para o caso da amostragem em luzerna existem diversos tipos de equipamento de amostragem e que o produtor que decida efectuar amostras, ao adquirir o amostrador, deve tomar em conta os custos e as suas preferências individuais quanto ao modelo a adquirir, pois este poderá conter uma broca manual ou eléctrica o que tornará diferente o seu preço. Quanto às características técnicas, os amostradores poderão também conter um adaptador extensível para a sonda, de modo a conseguir uma amostra mais profunda. O material em que é produzido o amostrador poderá ser o aço inoxidável. Os mesmos autores referem que o tipo de sonda não afecta significativamente a precisão da recolha.

Apresentam-se neste capítulo alguns modelos de equipamento de recolha de amostras para luzerna utilizados nos Estados Unidos e divulgados em 1994 pela Oklahoma State University. Os modelos de equipamento apresentados, poderão ser reproduzidos com vista à amostragem de outros tipos de forragens.



**Amostrador Hay Probe:** - É feita de aço inoxidável com uma ponta afiada de aço endurecido. A sonda contém um pequeno recipiente onde podem ser acumuladas até 25 colheitas enquanto se retiram amostras dos fardos. Os tubos podem ser de 35,5 cm ou 61,0 cm com um corte de núcleo de 1,5 cm. A sonda foi desenhada para ser usada com uma cinta manual, mas pode funcionar a baixas velocidades com uma broca eléctrica



**Amostrador Hay Chec:** - É feita de aço inoxidável com uma ponta serrilhada em aço temperado. O tubo é de 12 cm de comprimento e o núcleo de corte de 0,44 cm de diâmetro. A unidade tem um corpo grande, com punhos para empurrar. A sonda funciona através de puxadores accionados manualmente. Possui um recipiente para acumulação do material recolhido.



**Amostrador Oakfield:** - É feito de aço inoxidável com uma ponta serrilhada substituível através de rosca. O tubo tem 18 cm de comprimento e um núcleo de corte de 0,75 cm de diâmetro. As amostras são retiradas através de uma zona aberta do tubo à medida que forem sendo efectuadas as recolhas. Podem ser adaptadas extensões a este tubo para captações mais profundas. Este modelo de sonda poderá funcionar manualmente ou através de broca eléctrica.



**Amostrador Penn State:** - É feito de aço inoxidável com uma ponta de corte substituível em aço temperado. O tubo é de 18 cm de comprimento e o núcleo de corte é de 0,75 cm de diâmetro. O equipamento pode funcionar com uma broca eléctrica ou manualmente. A sonda deverá ser desmontada e esvaziada entre cada amostragem. Podem ser adaptadas extensões a este tubo para captações mais profundas.



**Amostrador Hay Utah:** - Feito de aço, com uma ponta serrilhada substituível, em aço temperado. O tubo é de 15 cm de comprimento e o diâmetro de corte é de 1,3 cm. Possui roscas externas no tubo, para ajudar a puxar a amostra do fardo.

#### **2.4.1.4 NUMERO DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS**

Segundo Undersander *et al.* (2005), devido à variação entre fardos do mesmo lote, é importante colher para amostragem fracções de 20 fardos rectangulares pequenos e de 8 a 10 fardos se estes forem de grande dimensão. O número de amostras dentro dos intervalos referidos, deve contudo, ser maior quando a heterogeneidade entre fardos for também maior ou mesmo quando a variação da homogeneidade da forragem for mais evidente, referem os mesmos autores. Até aqui, os fardos rectangulares de pequena dimensão têm sido mais estudados do que os de grande dimensão, contudo é importante que se intensifique o estudo da amostragem nos fardos grandes pois começa a ser a dimensão mais frequente no Alentejo. Rosalino, (1986), referia que o numero mínimo de fardos rectangulares de pequena dimensão a amostrar por exploração, era de 16.



## **2.4.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA FORRAGEM MADURA**

O valor energético de uma forragem depende, antes de tudo, do seu teor em matéria orgânica, digestível e, por isso, do coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica, que se chamará aqui de digestibilidade. Esta varia consideravelmente com: o estado vegetativo; a idade ou o número de ciclo de uma mesma planta; a espécie vegetal para um dado estado ou idade; o sistema de colheita e de conservação (Demarquilly e Jarrige, 1981).

A composição morfológica e a idade são as duas características principais que afectam a digestibilidade da planta madura e permitem, por isso, prevê-la.

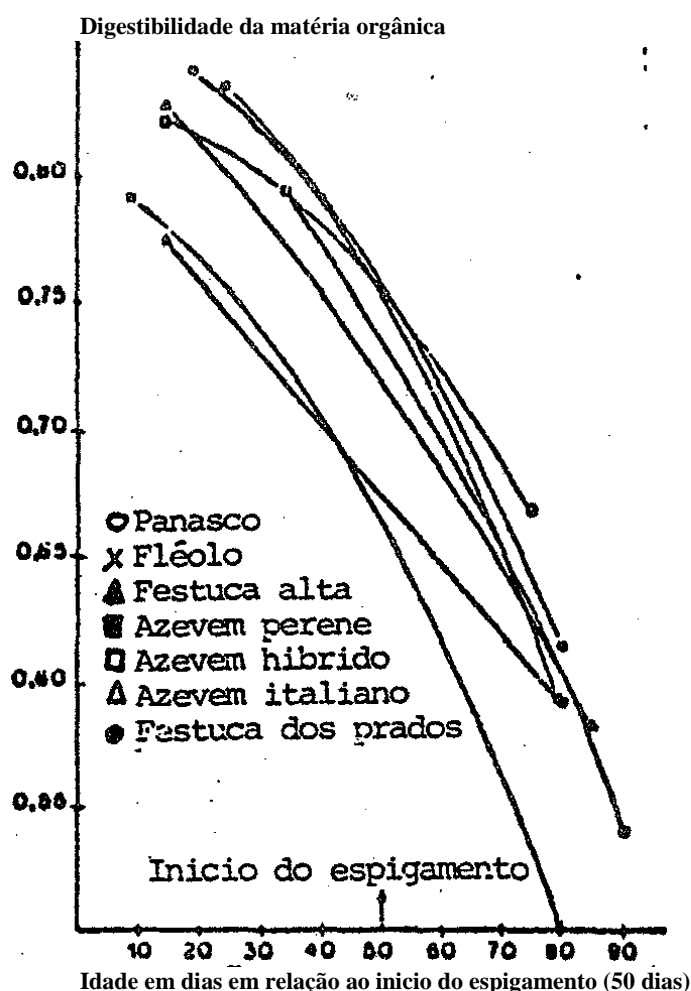
### **2.4.2.1 PRIMEIRO CICLO DE CRESCIMENTO**

No decurso do 1º ciclo a digestibilidade de uma dada espécie depende, quase exclusivamente, do seu estado de desenvolvimento. Nas gramíneas a digestibilidade é elevada (0.80, 0.85) no início do ciclo vegetativo, diminui lentamente até um estado compreendido entre 10 cm de altura e o aparecimento do primeiro afilhamento (consoante as espécies), depois mais rapidamente (de 0.004 a 0.005 por dia) (equivalente a 0.4 e 0.5 pontos por dia quando a digestibilidade é expressa em %, como por exemplo 80), encontrando-se valores compreendidos entre 0.55 e 0.65 na floração. Ao contrário, a digestibilidade da luzerna, do trevo violeta e do sanfeno, diminui linearmente ao longo do 1º ciclo de crescimento. Segundo (Demarquilly e Chenost, 1979 e Chenost *et al.*, 1970, citados por (Demarquilly e Jarrige, 1981), esta redução resulta essencialmente da diminuição da relação folhas: caules, em benefício da proporção de caules, cuja digestibilidade é mais fraca e diminui mais rapidamente com a idade da planta do que a das folhas. O ano, o local de cultura ou a variedade, têm pouca influência na digestibilidade de uma espécie, num dado estado do 1º ciclo vegetativo (Demarquilly e Jarrige, 1981).

A evolução da digestibilidade das diferentes espécies, ao longo do 1º ciclo de crescimento, é assim muito reprodutível. Andrieu *et al.* (1981, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981) puderam, assim, calcular as equações lineares ou curvilíneas (Figura 18) entre a digestibilidade e a idade ( $x = 50$  dias quando 5% das plantas estão espigadas no caso das gramíneas, ou quando 5% das plantas estão floridas no caso das

leguminosas) e entre a digestibilidade e a relação caules+espigas. A idade explica 75 a 94% das variações na digestibilidade, e o pequeno desvio padrão da previsão está compreendido entre 0.034 e 0.013, conforme as espécies. O número de dias de crescimento é, contudo, um bom critério de previsão da digestibilidade de cada espécie, o que segundo Demarquilly e Jarrige (1981), confirma os resultados de Homb (1953) Reid *et al.* (1959) e Minson *et al.* (1960,1964).

Da mesma forma, a composição morfológica da planta é também um bom critério (o desvio padrão da previsão está compreendido entre 0.052 e 0.026, conforme as espécies) principalmente quando é associada à idade. Ela explica principalmente que, para uma dada idade, as variedades tetraploides, um pouco mais folhosas, são um pouco mais digestíveis que as variedades diploides da mesma precocidade, ou que a maioria das variedades precoces são um pouco mais digestíveis que as variedades tardias da mesma espécie.



Fonte: Demarquilly e Jarrige, 1981.

Figura 18. Relação entre a digestibilidade da matéria orgânica e a idade, para gramíneas, no decurso do 1º ciclo vegetativo

Segundo Dentinho *et al.* (1993), o valor nutritivo do tritical Forrageiro diminui significativamente ( $P < 0,05$ ) com a maturação da planta, tanto em verde como em feno.

Os mesmos autores referem ainda que os melhores valores correspondem à fase de emborrachamento havendo, contudo, necessidade de conjugar qualidade com quantidade de planta disponível.

Bento *et al.* (1987a) referem não ter encontrado diferenças significativas em duas épocas de corte, quanto a produções de MS e MO, encontrando contudo uma interacção significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre a época de corte e o tipo de forragem, o que originou produções menores de feno na 2ª época de corte.

#### **2.4.2.2 CICLOS DE RECRESCIMENTO**

A digestibilidade dos caules em recrescimento (ervilhaca italiana, luzerna, trevo violeta) diminui linearmente, durante o segundo ciclo de crescimento, e quase tão rapidamente como no decurso do 1º ciclo (de 0.004 a 0.0025/dia), sendo a idade expressa pelo numero de dias depois do corte precedente. A diminuição é muito mais lenta (0.015 a 0.025/dia) no decurso do 3º e sobretudo do 4º ciclo de crescimento, porque a proporção de caules aumenta menos rapidamente (Deinum *et al.*, 1968 e Minson e Mac Leod, 1970, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Pelo contrário, a digestibilidade dos recrescimentos das gramíneas unicamente foliares diminui lentamente (0.0010 a 0.0020/dia) e é, para a mesma idade, praticamente independente do número do ciclo (Deinum *et al.*, 1968 e Minson e Mac Leod, 1970, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Segundo os mesmos autores, o ano e local da cultura podem modificar a digestibilidade dos recrescimento, numa dada idade. Parece, com efeito, que a digestibilidade é mais fraca nos anos ou nas regiões com Verões secos e quentes, o que confirma a influência negativa da temperatura e evapotranspiração na digestibilidade.

A digestibilidade dos recrescimentos, contudo, depende ainda da idade, mas de uma maneira menos acentuada do que no 1º ciclo; é assim que a idade não explica mais do que 15 a 73% das variações da digestibilidade dos recrescimentos do 2º ciclo. No entanto, a digestibilidade, variando em limites mais estreitos, não apresenta um desvio padrão de previsão, a partir da idade, muito mais elevado (0.016 a 0.038, consoante as

espécies) que para as forragens do 1º ciclo. Da mesma forma, a digestibilidade depende ainda da composição morfológica, no caso dos caules recrescidos.

Definitivamente, o estado de desenvolvimento no 1º ciclo ou a idade para os recrescimentos permite prever a digestibilidade (ou directamente o valor nutritivo) das forragens verdes com uma precisão muito satisfatória, por vezes muito melhor do que a partir das análises químicas efectuadas no laboratório (Demarquilly e Jarrige, 1981).

Quanto à digestibilidade das forragens conservadas, ela pode ser prevista a partir da digestibilidade da forragem verde no momento da colheita, e das modificações na digestibilidade produzidas pelos diferentes métodos de conservação. A precisão da previsão é da mesma ordem que para as forragens verdes, no caso das forragens desidratadas ou das forragens ensiladas, já que a desidratação e a ensilagem modificam muito pouco a digestibilidade das forragens. Pelo contrário, a previsão é muito menos precisa no caso dos fenos, pois a diminuição da digestibilidade devido à fenação é mais importante, e sobretudo muito mais variável, do que a conduzida pelos outros métodos de conservação. Ela depende, principalmente, das condições climáticas na altura da fenação (Demarquilly e Jarrige, 1981).

### **2.4.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO VALOR NUTRITIVO DAS FORRAGENS**

A medição da digestibilidade nos animais é longa e muito dispendiosa. Para formular arrazoamentos para animais é preciso, portanto, dispor de métodos de laboratório que permitam prever a digestibilidade e o valor energético das forragens disponíveis, com uma precisão satisfatória e com o menor custo possível (Demarquilly e Jarrige, 1981). Jarrige, (1970 e 1980); Van Soest (1971 e 1975); Fonnesbeck (1976); Morrison (1976); Osbourn (1977) e Osbourn e Siddons (1980) (Citados por Demarquilly e Jarrige, 1981); Lopez *et al.* (2007); Krishnamoorthy, *et al.* (2005); France *et al.* (2000); (Dijkstra *et al.* (2005), são investigadores que muito têm contribuído para estes domínios de estudo.

#### **2.4.3.1 MÉTODOS QUÍMICOS**

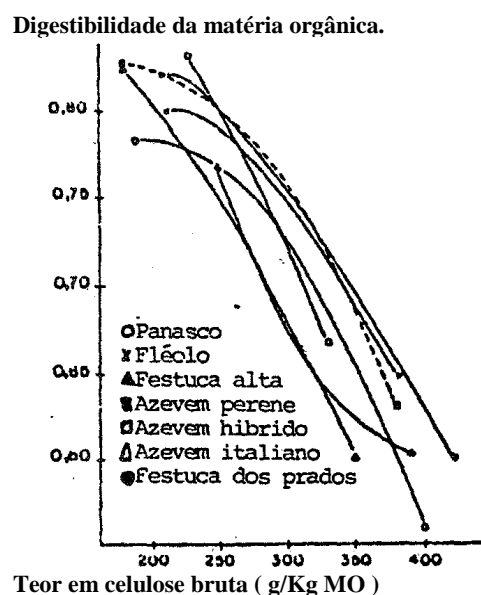
Tem-se procurado prever a digestibilidade das forragens a partir da composição química, para pôr equações à disposição dos laboratórios que trabalham em série. Estas relações foram objecto de um grande número de trabalhos, como, por exemplo, as revisões de Barnes (1973); Morrison (1976); Jarrige (1980) (citados por (Demarquilly e

Jarrige, 1981). Segundo Jarrige (1981) (citado por (Demarquilly e Jarrige, 1981), a digestibilidade da forragem está ligada, positivamente, ao teor de constituintes citoplasmáticos totais e, negativamente, ao teor de paredes lenhificadas e cutinizadas. Sendo o teor em constituintes citoplasmáticos aparentemente não digestíveis pouco variável (normalmente de 12 a 14 % da matéria seca), é o teor em constituintes parietais não digestíveis que determina o teor em matéria orgânica não digestível da forragem. Prever a digestibilidade das forragens é, antes de tudo, prever o seu teor em constituintes parietais não digestíveis.

### A celulose bruta

É a lenhina que é o factor original fundamental da digestibilidade das paredes e não a celulose bruta. Mas o teor em celulose bruta é, geralmente, um bom critério de indigestibilidade parietal de uma dada planta, porque está relacionada positivamente com o teor em paredes e com o teor em lenhina, o que prova a relação negativa muito estreita entre o teor e a digestibilidade da própria celulose bruta (Jarrige, 1981, citado. por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Estas relações são mais estreitas no decurso dos ciclos de recrescimento dos caules, logo nas leguminosas, e no decurso do 1º ciclo das gramíneas (Figura 19). A celulose bruta permite, então, prever a digestibilidade das diferentes espécies, com uma precisão geralmente muito satisfatória.



Fonte: Demarquilly e Jarrige, 1981.

**Figura 19. Relação entre a digestibilidade da matéria orgânica e o teor em celulose bruta para as gramíneas, no decurso do 1º ciclo vegetativo.**

No entanto, segundo Demarquilly e Jarrige (1981), a precisão decresce logo que as plantas estejam próximo da floração, e que o seu teor em celulose bruta ultrapasse 30-35%. Segundo os mesmos autores, embora a digestibilidade continue a diminuir linearmente com o tempo (Figura 20), o teor em celulose aumenta cada vez mais lentamente até estabilizar a partir da plena floração, em algumas gramíneas. Esta evolução curvilínea do teor em celulose bruta, notada desde há muito tempo por Kivimae (1959) (citado por Demarquilly e Jarrige, 1981), é devida ao lugar tomado pelas inflorescências (de 7 a 17% em média da matéria seca, consoante as espécies).

Nas gramíneas, as inflorescências contêm, com efeito, nitidamente menos celulose (de 20 a 25%), mas mais xilose (18%) e hemiceluloses (15 a 20%), que os caules propriamente ditos (Jarrige, 1963, citado por Demarquilly e Jarrige, 1981). Este facto explica as relações curvilíneas entre a digestibilidade e a celulose bruta, no 1º ciclo de um grande número de gramíneas (Figura 19), e o interesse de incluir o teor em matérias azotadas nas relações (se bem que este teor diminua muitas vezes de uma forma cada vez mais lenta, neste período, ele está ligado com a idade, de uma forma mais estreita que a celulose bruta). As inflorescências são também, em parte, responsáveis pela má previsão da digestibilidade dos fenos colhidos a partir do início da floração (Demarquilly e Jarrige, 1981).

As relações entre a digestibilidade e o teor em celulose bruta são, em geral, menos estreitas para os recrescimentos foliares do que para os primeiros ciclos. Isto pode resultar de uma menor relação entre o teor em celulose bruta e o teor em lenhina, de uma relação mais frouxa entre o teor e a digestibilidade das paredes (pela acção dos factores climáticos.....), sem esquecer a zona das variações destes parâmetros é muito mais reduzida que no 1º ciclo (Demarquilly e Jarrige, 1981).

As relações entre a fracção indigestível parietal e os teores em lenhina e em celulose bruta, são mais ou menos diferentes, entre ciclos de crescimento da mesma planta, entre espécies e entre famílias botânicas. É preciso, então, estabelecer as equações de previsão para cada uma destas categorias de forragens. É para as forragens de prados naturais que elas são, mais incorrectas, porque a sua flora pode variar de uma região para a outra, e mesmo de um prado para o outro, no interior de uma mesma região (Demarquilly e Jarrige, 1981).

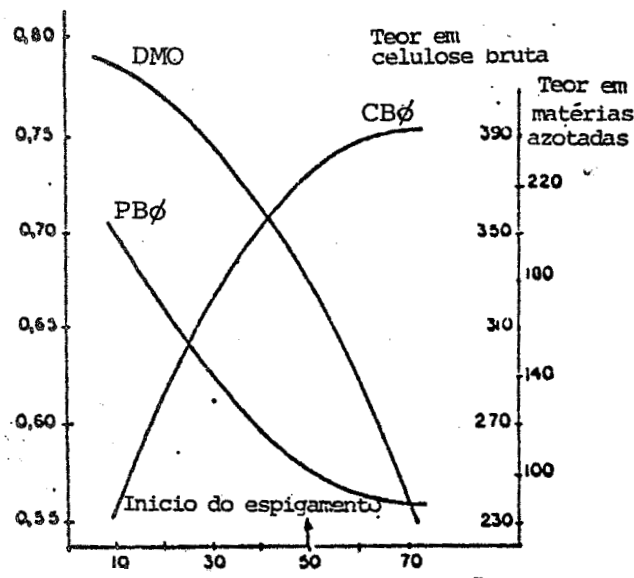
## Equações

$$\text{DMO} = 0,788 - 4,66 \cdot 10^{-5} X^2 \pm 0,02 \quad r = 0,972$$

$$\text{PB}\phi = 239,2 - 4,2 X + 0,030 X^2 \pm 17 \quad r = 0,911$$

$$\text{CB}\phi = 179,5 + 6,0 X - 0,043 X^2 \pm 20 \quad r = 0,937$$

### Digestibilidade da matéria orgânica



Idade expressa em dias em relação ao início do espigamento (idade = 50)

Fonte: Demarquilly e Jarrige, 1981

**Figura 20.** Evolução da digestibilidade da matéria orgânica (DMO), e dos teores em matérias azotadas (PBφ) e em celulose bruta (CBφ) em g/Kg de matéria orgânica, do fléolo em função da idade (X), no decurso do 1º ciclo vegetativo

## Os constituintes parietais simples em substituição da celulose bruta

Um dos critérios mais utilizados é o resíduo insolúvel no detergente ácido (“ADF”) de Van Soest (1963), devido à sua rapidez. Nas comparações efectuadas com a celulose bruta (Quadro 6), este permitiu, no conjunto, prever a digestibilidade, com uma precisão sensivelmente melhor. Esta melhoria, tal como a observada com os outros complexos lenhícelulosicos (Quadro 7), é provavelmente devido ao facto que estes complexos lenhícelulosicos contêm a totalidade da lenhina.

A previsão pode ser ligeiramente acrescida, para alguns grupos de forragens, mas não para todas, alongando a duração do tratamento para 2 horas (“ADF” modificado por Clancy e Wilson, 1966, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981, ou mais (até 6 horas)

(Mc Leod e Minson, 1972, citados. por Minson, 1982a), aumentando a concentração da solução ácida (Mc Leod e Minson, 1972, citados. por Demarquilly e Jarrige, 1981) ou corrigido o “ADF” pelo seu teor em cinzas (Demarquilly e Jarrige, 1981). Mas esta adaptação das condições óptimas de tratamento a cada grupo de forragem necessitará de muito tempo e introduz complicações que, sem dúvida, não valem a pena numa avaliação que se pretende rápida do valor nutritivo duma forragem ( Demarquilly e Jarrige, 1981).

O teor em paredes totais, ou “NDF”, é muito inferior ao “ADF” ou à celulose bruta, para prever a digestibilidade das forragens (Van Soest e Mertens, 1977, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), mas é um bom critério de digestibilidade. Segundo Demarquilly e Jarrige, (1981), ele parece muito prometededor para caracterizar os constituintes parietais não digestíveis.

**Quadro 6. Comparação entre as análises de Van Soest e a celulose bruta na precisão da previsão da digestibilidade das forragens (100 X DMS ou DMO),**

FORRAGEM	Nº. de amostras	Digesti- bilidade	Precisão	Celulose bruta	"ADF"	"ADL "	Autores
Leguminosas e gramíneas		MS	SR	11,0	9,0		Van Soest 1973 <sup>(1)</sup>
Forragens diversas	187	MS	R		-0,75	-0,61	Mertens 1972 <sup>(2)</sup>
Gramíneas verdes	12				3,0	2,2	Van der Koelen e Van Es. 1973 <sup>(3)</sup>
	41			4,1			
Feno de gramíneas	56	MO	SR		2,6	2,5	
	75			2,8			
Silagem de gramíneas	18				3,0	2,9	
	30			4,4			
Feno de gramíneas	42			7,1	6,0	4,9	Aerts e al (1977b) <sup>(3)</sup>
Silagens	56	OM	CV	6,8	7,1	5,6	
Forragens desidratadas condensadas	39			8,5	7,5	8,4	
Forragens verdes	46	MO	CV	5,0	5,0		Kirchgessner e Kellner - 1977
Leguminosas tropicais	32	MS	SR	3,7	2,2	3,7	Nc Leod e Minson (1976)
Luzerna (verde e feno)	35			3,2	2,8		Jarrige, Demarquilly e Robelin (não publicado) <sup>(4)</sup>
Gramíneas verdes	57	MS	SR	4,3	4,4		
Fenos de prado	32			2,8	2,4		
Silagem de gramíneas	26			5,9	4,4		

Fonte: (Demarquilly e Jarrige, 1981)

(SR: erro padrão da média; R: coeficiente de correlação; CV: Coeficiente de variação).

<sup>(1)</sup> Segundo Van Soest e Robertson (1980)

<sup>(2)</sup> Segundo Van Soest e Mertens (1977)

<sup>(3)</sup> Lenhina extraída do "ADF" pelo permanganato, Lenhina e "ADF" são corrigidos pelo teor em cinzas.

<sup>(4)</sup> O teor em matérias azotadas é incluído na equação de regressão. O "ADF" é corrigido pelo teor em cinzas.



## **A lenhina e os outros constituintes parietais**

A lenhina, sendo o factor fundamental da indigestibilidade das paredes celulares, permitirá uma melhor previsão da digestibilidade das forragens que a celulose bruta, desde que seja correctamente doseada (Demarquilly e Jarrige, 1981).

A superioridade da lenhina sobre a celulose bruta é máxima quando é aplicada ao conjunto de forragens, de espécies e de ciclos diferentes (Demarquilly e Jarrige, 1981). É preciso, no entanto, estabelecer as relações separadas, pelo menos para as gramíneas e as leguminosas, porque para um teor de lenhina igual as leguminosas têm uma digestibilidade dos constituintes parietais mais elevada do que as gramíneas.

Associando à dosagem da lenhina a da hemicelulose e a da celulose, melhorou-se a previsão da digestibilidade para todas as categorias de forragens (Quadro 7), até um nível geralmente muito bom. Da mesma forma, no sistema de análises com detergentes, combinando o “NDF”, o “ADF” e a lenhina, obtém-se uma melhor previsão da digestibilidade do que só com o “ADF” ( Van Soest e Robertson, 1980; Osbourn *et al*, 1976; Aerts *et al*, 1977<sup>a</sup>, 1977<sup>b</sup>, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981). Uma relação muito boa foi também estabelecida na Holanda, a partir dos teores em “NDF”, lenhina e ácidos urónicos (Gaillard e Nukamp, 1968; Van Der Koelem e Van Es, 1973, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981). Em todos os casos, os melhoramentos da previsão da digestibilidade parecem, no entanto, muito caros para a aplicação em série (Demarquilly e Jarrige, 1981).

Em conclusão, se a lenhina doseada por um método correcto, é o melhor critério de determinação da digestibilidade dos constituintes parietais, falta, contudo, um tratamento químico simples que isole um resíduo igual, ou proporcional, aos constituintes da parede celular não digestíveis. Esse método químico deveria, por isso, solubilizar a fracção digestível dos hidratos de carbono parietais, sem atacar a fracção não digestível dos hidratos de carbono parietais, (Demarquilly e Jarrige, 1981).

**Quadro 7. Precisão (erro padrão da média) da previsão da digestibilidade da matéria orgânica (100x DMO), a partir de critérios parietais simples e da análise sequencial das paredes (além do teor em matérias azotadas).**

Amostra		Critérios parietais simples			Análise sequencial das paredes <sup>(1)</sup>				
		Nº	Celulose bruta PB <sup>(3)</sup>	Lenhina celulose PB	Hemi-celuloses PB	Celulose PB	Lenhina <sup>(2)</sup> PB		Hemiceluloses celulosas lenhina <sup>(2)</sup> PB
Azevem	1º Ciclo	17	2,6	2,3	2,9	2,7	2,3	2,5	1,9
	Recrescimentos	13	2,2	2,2	2,3	2,2	1,8	2,2	2,1
	Ambos	30	2,8	2,6	3,2	3,0	2,3	2,5	2,3
Panasco	1º Ciclo	19	3,9	3,4	3,9	3,8	1,8	2,8	1,9
	Recrescimentos	13	2,8	2,7	2,7	2,9	2,6	1,9	2,0
	Ambos	32	4,1	3,6	4,4	4,1	2,8	3,3	2,7
Festuca do prado		20	3,9	4,1	4,9	4,4	3,9	4,2	2,9
Azevem italiano		14	2,5	2,4	2,9	2,8	2,0	2,8	2,4
Ambas as gramíneas		96	4,2	4,1	4,9	4,6	3,0	4,1	3,0
Luzerna		35	3,2	2,8	3,8	3,4	2,8	3,1	2,7
Trevo violeta									
Trevo branco		18	4,0	4,0	4,8	4,7	3,8	4,0	3,6
As 3 leguminosas		53	3,4	3,2	5,2	4,0	3,4	3,7	3,0
Feno de prado		35	3,5	3,2	4,2	4,0	3,4	3,9	2,8

Fonte: (Jarrige e Robelin, não publicado, citado por Demarquilly e Jarrige, 1981).

<sup>(1)</sup> a análise sequencial segundo Jarrige (1961) compreende 2 extrações em água e em álcool-benzeno e 2 hidrólises H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (3 horas) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. As hemiceluloses e a celulose são determinadas pelo poder reductor (x 0,9) dos açúcares das hidrolisadas. A lenhina é corrigida para o seu teor em matérias azotadas. As paredes são a soma das hemiceluloses + coluloses + lenhina e não compreende os ácidos urônicos. Azevem inglês e Panasco: digestibilidade medida no G.R.I. DE Hurly, analisado por Jarrige e Minson (1964) Outras forragens: digestibilidade medida por Demarquilly e outros, analisadas por Sincon e Jarrige.

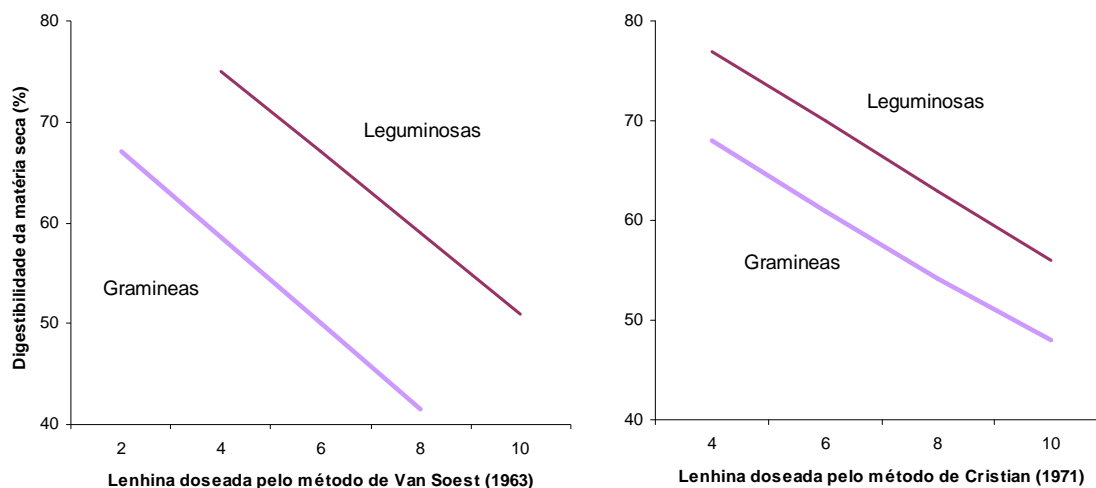
<sup>(2)</sup> Regressões  $Y = a + bx + cx^2$

<sup>(3)</sup> PB = Proteína Bruta

Muitas equações têm sido publicadas, relativas à DMS e DMO, respeitante à lenhina contida na matéria seca (MS) dos alimentos e todas as equações mostram a relação negativa entre a digestibilidade e o teor em lenhina. (Minson, 1982a).

Apesar de existirem muitas equações de regressão para previsão dos parâmetros referidos, existem grandes diferenças entre elas.

As causas podem estar no método utilizado para a determinação da lenhina, ou ainda no tipo de alimentos utilizados para análise e derivação das equações (por exemplo: gramíneas *versus* leguminosas). Há também uma interação entre os alimentos e o método usado para determinação da lenhina (Minson, 1982b). Pequenas diferenças entre regressões, para gramíneas e leguminosas, foram encontradas com o método usado por Cristian (1971) citado por Minson, 1982b).



Fonte: Equações de Sullivan (1964) e MacLeod e Minson (1976) (citados por Minson 1982b).

**Figura 21. Efeito dos diferentes métodos para determinação da lenhina na diferença entre as rectas de regressão de gramíneas e leguminosas, relacionando a digestibilidade da matéria seca com o teor de lenhina do alimento.**

Mas, Van Es (1982) afirma que tem sido dada demasiada atenção à lenhina, como causa única e directa da baixa digestibilidade.

Nalgumas espécies de plantas, por exemplo o arroz, a presença de sílica diminui a digestibilidade. Porém, a razão principal para a observada diminuição da digestibilidade parece ser o elevado grau de interligação da hemicelulose, celulose, lenhina e sílica com a avançada maturidade da planta. É este grau de ligação físico-química que tem que ser, de facto, estimado para a previsão precisa da digestibilidade da matéria orgânica (Morrison, 1979; Jarrige 1980; Van Soest e Robertson, 1980; Chesson, 1981; Van Es e Van der Meer, 1981 citados por Van Es 1982). Os teores da celulose, hemicelulose e lenhina aumentam com o avançar da maturidade e, conforme esse avanço, aumenta também o grau de interligação. Esta é a razão porque a fibra bruta, “ADF”, e a lenhina podem, até certo ponto, correlacionar-se com a digestibilidade. Porém, mesmo que sejam tomadas em conjunto, elas não dão uma imagem completa da ligação físico-química (Van Es 1982).

Van Es (1982) diz que, acima de tudo, entre as diferentes espécies de plantas, e mesmo dentro de cada espécie, existem grandes diferenças na estrutura e composição da parede celular, o que explica porque é que a composição, por si só, não é a melhor base para prever a digestibilidade da matéria orgânica.

### 2.4.3.2 MÉTODOS FÍSICOS

A resistência à trituração de uma forragem depende, antes de tudo, do seu teor em paredes e da sua lenhificação. Chenost (1966) e Chenost Grenet (1971) (citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), mediram a energia necessária para triturar uma forragem e mostraram que ela varia no sentido inverso da digestibilidade e da ingestibilidade da forragem. Os limites de variação são consideráveis: em valor relativo, a energia necessária varia de 1 a 10, quando se compara uma erva jovem a uma palha. Esta energia necessária para a trituração, que se chama o índice de fibrosidade, demonstra ser melhor indicador da digestibilidade do que a celulose bruta e “ADF” (Demarquilly e Jarrige, 1981) (Quadro 8).

**Quadro 8. Previsão da digestibilidade da matéria orgânica (100xDMO) pela medida da resistência à trituração (I. F. = Índice de fibrosidade). Correlação e respectivo erro padrão**

FORRAGENS	CRITÉRIO	r	SR
34 Amostras de Gramíneas no 1º ciclo de vegetação	Índice de Fibrosidade	0,839	4,2
	Celulose Bruta	0,810	4,7
	Acid Detergent Fiber	0,829	4,5
152 Amostras de Forragens Verdes ou de feno de gramíneas e de leguminosas	Índice de Fibrosidade	0,851	4,3
	Celulose Bruta	0,838	4,5

Fonte: . (Demarquilly e Jarrige, 1981).

A simplicidade, aliás mais aparente do que real, e a rapidez deste método, estavam anuladas por uma má reprodutividade, com o aparelho inicial era necessário repetir 6 vezes as medições para ter uma estimativa satisfatória da energia necessária para triturar uma forragem, por causa das variações devidas ao modo de introdução da forragem no triturador (Demarquilly e Jarrige, 1981). Parece existir agora um material de medida melhor sucedido (Minson e Cowper, 1974 citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

### 2.4.3.3 METODOS MICROBIOLÓGICOS

#### Digestibilidade *In Vitro*

Grande número de métodos de digestibilidade *in vitro* têm sido propostos, desde 1955, (Revisão de Jphnson, 1969, citado por Demarquilly e Jarrige, 1981); eles diferem na preparação do líquido ruminal, nas respectivas proporções de forragem e fase líquida, na técnica operatória, no tempo de incubação e na medição do constituinte digerido (celulose, matéria seca, matéria orgânica). Todos foram suplantados pela técnica em dois tempos de Tilley e Terry (1963) que provou ser a mais interessante nas comparações feitas, principalmente nos USA (Oh, Baumgarde e Shcoll, 1966; Barnes, 1969, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Aplicado tal e qual, ou com modificações mínimas, por exemplo acidificação a pH 1,2 (Alexander e McGowan, 1961), o método foi utilizado por numerosos autores que o têm considerado sempre mais satisfatório que os métodos químicos (Quadro 9), sendo a previsão das estimativas muitas vezes inferiores a  $\pm 0.03$  (Revisões de Osbourn e Sidons, 1980, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

**Quadro 9. Comparação da precisão (erro padrão da média) da previsão da digestibilidade das forragens (100\*DMO) pelos métodos físicos e microbiológicos**

Amostras		Nº de Amostra	MÉTODOS QUÍMICOS			MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	
			Celulose Bruta	"ADF"	Lenhina pelo método de Van Soest	Digest. * <i>in Vitro</i> *	Digest. em sacos de nylon
Aerts <i>et al.</i> (1977b)	Feno de gramíneas	42	4,5	3,8	3,1	2,0	1,5
	Silagens	56	4,2	4,4	3,4	3,8	3,4
	Forragens desidratadas condensadas	39	5,4	4,8	5,4	2,9	2,7
Van Der Koelen e Van Es (1973)	Gramíneas verdes	12		3,0	2,3		
		41	4,1			2,0	
	Feno de gramíneas	56			2,6	2,5	
		75	2,8				2,1
	Silagem de gramíneas	18			3,0	2,9	
		30	4,4				2,5
Oh <i>et al.</i> , (1966)	Feno de gramíneas e de leguminosas	56		5,3	5,5	3,0	

Fonte: (Demarquilly e Jarrige, 1981).

Sendo rápida e barata, a medição da digestibilidade *in vitro* foi então adoptada por um grande número de laboratórios de investigação do mundo (Demarquilly e Jarrige, 1981).

No entanto, a sua reprodutibilidade não é sempre satisfatória, de uma série para a outra, ou de um laboratório para outro, como demonstrou uma comparação na qual participaram 19 laboratórios de investigação americanos (Barnes, 1969, citado por Demarquilly e Jarrige, 1981). Mesmo padronizado rigorosamente o regime alimentar dos animais, e as condições de extracção e de preparação “inoculum” a média das digestibilidades *in vitro* das mesmas 12 forragens, medidas três vezes (3 séries) variou. O duplicado em cada série variou de 0,571 a 0,642. Quanto aos coeficientes de variação entre séries foram de 1,1 a 4,4%, consoante o laboratório. Pode-se, no entanto, reduzir tais variações entre séries e entre laboratórios, utilizando forragens testemunhas e brancos, para detectar as séries com resultados aberrantes. Da mesma forma é, sem dúvida preferível retirar, para cada série, o líquido ruminal em vários animais (carneiros), do que num só (bovino) (Demarquilly e Jarrige, 1981). Marten e Barnes (1979) preocuparam-se com estes aspectos (fontes de variação da digestibilidade obtida pelo método de Tilley e Terry) e apresentaram um sistema muito detalhado para minimizar essas fontes de variação.

### **Técnica de Produção de Gás *In Vitro* (IVGPT)**

A técnica de produção de gás *in vitro* tem sido muito usada na última década em nutrição animal para a avaliação de alimentos, investigação de mecanismos de fermentação microbológica, estudo do modo de acção de factores anti-nutritivos, de aditivos e de suplementos alimentares e para estudar a cinética de processos de fermentação microbológica no tracto digestivo (Lopez *et al.*, 2007). Embora esta técnica seja usada principalmente em estudos com ruminantes (Close e Menke, 1986; Dijkstra *et al.*, 2005 citados por Lopez *et al.*, 2007), pode também ser aplicada em estudos de avaliação de alimentos em humanos e animais monogástricos (Williams *et al.*, 2005 citados por Lopez *et al.*, 2007). A técnica é baseada no pressuposto de que o gás produzido em culturas *in vitro* com um inoculo microbial (fluido do rumen, produto da digestão no intestino grosso ou fezes), é apenas consequência da fermentação de um determinado substrato (France *et al.*, 2000 citados por Lopez *et al.*, 2007). O gás produzido cumulativamente em vários tempos de incubação pode ser medido numa única amostra, providenciando dados cinéticos através dos quais é possível estimar qual a extensão e taxa de degradação do alimento. Para medir a pressão do gás produzido por fermentação num determinado intervalo de tempo, foram desenvolvidos vários sistemas

em que os mais simples consistiam no uso de garrafas de incubação nas quais o volume de gás acumulado e a respectiva pressão estavam relacionados através das leis clássicas aplicadas aos gases. O volume de gás está relacionado com a pressão através de um coeficiente calculado através da razão entre o volume de gás formado no topo e a pressão atmosférica. No entanto, por vezes o objectivo experimental é seguir a produção específica de um determinado gás, por exemplo, a formação de metano a partir do rumen que resulta da fermentação, por oposição à formação do gás total. Para o cálculo da produção de um gás específico, por exemplo metano, é necessário ter em consideração o gás acumulado e uma correcção aplicada a volumes maiores (Lopez *et al.*, 2007).

Recorrendo à modelação matemática, os dados obtidos *in vitro* podem ser associados aos processos que ocorrem *in vivo*, podendo assim, estimar-se a digestibilidade total do tracto ou a degradabilidade do rumen a partir dos dados cinéticos obtidos *in vitro* (Lopez 2005). Os parâmetros cinéticos da fermentação podem ser determinados através de funções matemáticas para estimar a taxa de fermentação, pressupondo que a taxa em que o gás é produzido é directamente proporcional à taxa de degradação do substrato (France *et al.*, 2000 citados por Lopez *et al.*, 2007). No entanto, Lopez *et al.* (2007) verificaram que na interpretação dos perfis de produção de gás devem ser consideradas diferenças entre a taxa de degradação do substrato e a taxa de produção de gás. Aqueles autores observaram que o perfil da produção de gás seguia um modelo linear, providenciando o cálculo da taxa e da extensão da degradação de alimentos no rumen. Apesar deste modelo parecer aceitável, quando aplicado a outros alimentos, aqueles autores também observaram que os modelos não lineares mostravam alguma superioridade em termos de significância estatística, talvez pondo em dúvida o pressuposto de uma taxa de degradação constante.

Close e Menke (1986), referem que podem ser obtidos resultados genéricos por todas as técnicas *in vitro* os quais estão correlacionados com determinações *in vivo*, e neste contexto estas técnicas podem constituir uma contribuição valiosa para a avaliação de alimentos para animais.

A Técnica de Produção de Gás apesar de ter surgido em 1988 com Steingass, continua a manter questões metodológicas que carecem de mais abordagem, nomeadamente o processo de medição da produção de gás (Krishnamoorthy, 2005). Após efectuada pesquisa sobre esta técnica conclui-se que atendendo à natureza dos trabalhos

publicados se entende que a IVGPT está longe de ser uma técnica madura (Krishnamoorthy, 2005).

### **Digestibilidade “in sacco de nylon”**

A técnica “in situ” ou técnica dos sacos de nylon suspensos no rumem, deriva da técnica das bolsas de seda utilizadas por Quinn *et al.*, (1938) citados por Demarquilly e Jarrige, (1981), para estudar a influencia da natureza do regime consumido pelo ruminante na digestão da celulose, no rumem. Foi em seguida utilizada por outros autores para estudar, quer a digestão da celulose, quer a digestão da matéria seca (revisão de Lowrey, 1969, citado por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Segundo Demarquilly e Jarrige, (1981) este método é provavelmente um dos melhores, do ponto de vista nutricional, mas é necessário que seja bem uniformizado (peso da matéria seca da amostra, tamanho do saco de nylon, abertura das malhas do tecido, tempo de estadia e local no rumem e natureza do regime consumido pelo animal) para dar resultados muito reprodutíveis.

As modificações à técnica, introduzidas por Demarquilly e Chenost (1969), permitiram encontrar valores da digestibilidade em estreita ligação com os obtidos *in vivo*, sendo a previsão da estimativa (Chenost *et al.*, 1970, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981) superior aquela obtida com a digestibilidade *in vitro* de Tilley e Terry (1963). O mesmo se deu com os ensaios de Aerts *et al.* (1977a e b) (citados por Demarquilly e Jarrige, 1981) (Quadro 9). A razão é que a digestibilidade em sacos é muito mais fisiológica, porque a digestão se efectua directamente no rumem. A técnica *in vitro* manifestou-se, portanto, muito interessante, tanto mais que ela permite também, com tempos de estadia mais curtos no rumem (12 horas), prever de uma forma satisfatória, a digestibilidade, a ingestibilidade da forragem (Chenost *et al.*, 1970, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Barnes (1973) e Pigden (1969) (citados por Marten e Barnes, 1979) apontam que a maior falha destes métodos é que são difíceis de standardizar, e são sujeitos a uma considerável variabilidade.

Barnes (1973), Monson *et al.* (1969) (citados por Marten e Barnes, 1979), indicam que investigações rigorosas referem uma elevada correlação entre os métodos *in vitro* (de



digestibilidade “in situ”) e a digestibilidade *in vivo* convencional, e/ou entre valores obtidos com o método de fermentação *in vitro* com líquido ruminal, para diversas forragens.

Aerts *et al.* (1977, 1981) (citados por Van Es, 1982), refere que o método dos sacos no rúmem simula melhor a digestão *in vivo* do que os métodos enzimáticos *in vitro*, especialmente quando seguidos da fase de pepsina – HCl. No entanto, a precisão com a qual é prevista a digestibilidade da MO, é pouco diferente da obtida através dos métodos de incubação *in vitro* com fluido ruminal, particularmente se forem usadas de maneira correcta as amostras padrão. O método é de uso limitado para laboratórios de rotina, porque são necessários muitos animais e também é necessária uma estandardização do tamanho dos sacos usados (Van Es, 1982). O mesmo autor refere ainda que o uso rotineiro das amostras padrão poderiam ser uma valiosa ajuda para obter uma maior precisão, mas que isso reduz o limite do número de amostras por animal, que podem ser testadas.

#### **2.4.3.4 METODOS ENZIMÁTICOS**

Como a actividade celulolítica é a principal característica da população microbiana no rumem (Jarrige e Thivend, 1969, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), procuraram reproduzi-la, utilizando preparações de enzimas celulolíticas extraídas de cogumelos. Depois de ter sido utilizado com pouco sucesso uma primeira “celulase” de origem americana, Dondfer *et al.* (1963) (citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), no Canada, tiveram mais êxito com uma “celulase” francesa, fabricada com fins farmacêuticos a partir de um *Basidiomycota* do solo. Era, na realidade, uma mistura de enzimas que atacavam a celulose, as hemiceluloses, as proteínas e o amido, e tinha uma acção comparável à da sua população microbiana do rumem, mas muito menos intensa. A matéria seca solubilizada durante 24 horas por esta “celulase” num meio tampão ou, correlativamente, o resíduo que fica, permite prever a digestibilidade das principais categorias das forragens com uma precisão tão boa como a digestibilidade *in vitro* medida segundo a técnica de Tilley e Terry (1963), e de uma forma mais simples e mais reproduzível (Jarrige e Thivend, 1969; Jarrige, Thivend e Demarquilly, 1970, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Revisões de Marten e Barnes (1979) e Osbourn e Siddons (1980) (citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), confirmaram estes resultados, com inclusão de forragens

tropicais. Eles beneficiaram de diversas celulasas mais activas, que apareceram no mercado, a maioria delas extraída da *Trichoderma viride* e do *Aspergillus niger*. Está demonstrado que um tratamento preliminar com a pepsina (Jones e Hayward, 1975, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981) aumenta a sensibilidade das paredes à celulase, e a precisão de previsão. Outros pré-tratamentos têm, aliás, sido propostos, tais como a solução com detergentes neutros, utilizados para preparar o “NDF” (Hartley *et al.*, 1974, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), e uma hidrólise por HCl 2N (Kellner e Kirchgessner, 1977, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981). As experiências actuais têm dois objectivos principais: por um lado, dominar as variações da actividade das preparações comerciais, e, por outro, encontrar uma celulase e as suas condições de utilização que permitam ter uma equação de previsão única para todas as forragens, como é o caso da digestibilidade *in vitro*. Uma equação comum às gramíneas e às leguminosas foi obtida com a sequência pepsina-celulase (Jones e Hayward, 1975, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), assim como com a sequência HCl – celulase – pepsina (Kellner e Kirchgessner, 1977, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981), mas não para Terry *et al.* (1978) (citados por Demarquilly e Jarrige, 1981).

Marten e Barnes, 1979 chegaram às seguintes conclusões, no que se refere ao uso de enzimas de fungos, para prever a energia digestível das forragens:

- 1 – Observações indicaram que a degradação através das celulasas dos fungos é frequentemente capaz de permitir uma previsão da digestibilidade das forragens (depois de um pré-tratamento, quer com ácido-pepsina, quer com detergente neutro) quase tão boa como a fermentação com fluido ruminal *in vitro*.
- 2 – A aplicação do método da pepsina-celulase, descrito por Jones e Hayward (1975) e, a sua modificação por Goto e Minson, (1977) e Mc Load e Minson (1979) (citados por Marten e Barnes, 1979), tanto para leguminosas como para gramíneas, necessita de confirmação noutros laboratórios. As celulasas dos fungos pareciam ser mais sensíveis às variações de espécies forrageiras do que o *inoculum* ruminal.
- 3 – Os benefícios adicionais do uso do pré-tratamento dos substratos com detergente neutro, seguido por uma solução potente de celulase padronizada, tal como é descrito por Roughan e Holland (1977) (citados por Marten e Barnes, 1979) com o objectivo de levar a digestão pela celulase até ao fim, necessitava confirmação.

- 4 – Como certas forragens diferem, umas mais do que outras, na resposta às celulases, devem ser incluídas amostras padrão de cada espécie a ser testada, com a digestibilidade conhecida, em cada ensaio.
- 5- A actividade das celulases seleccionadas deve ser medida, antes da sua utilização, através da incubação de amostras padrão de forragem e/ou papel de celulose, com diferentes concentrações de enzimas.
- 6 – Devido às celulases variarem muito na sua capacidade para digerir a fibra das forragens, seria necessário uma padronização das preparações celulases comerciais. No entanto, a produção de celulases padronizadas, em cada laboratório analítico, poderia também resolver este problema.

Os resultados obtidos em Theix por Andrieu e Aufrere (não publicado, citados por Demarquilly e Jarrige, 1981) eram muito prometedores. Aumentando as concentrações em ácido, após o tratamento com pepsina, e utilizando cadinhos filtrantes, eles obtiveram uma solubilização da matéria seca mais importante, e uma relação com a digestibilidade *in vivo* quase independente da família botânica das forragens e do seu modo de conservação.

Van es (1982) refere que um conceito inerente a estes métodos é expor as amostras às mesmas enzimas que aquelas encontradas, no rumem ou enzimas similares, e que nenhum dos métodos físicos e químicos, descritos anteriormente, utilizavam esta aproximação enzimática.

Em conclusão e conforme Van Es (1982), o melhor método de previsão da digestibilidade da matéria orgânica difere de caso para caso. No caso das amostras de forragem, para as quais exista uma informação insuficiente sobre as espécies de plantas que as compõem, são melhor analisadas pelo método *in vitro*. A escolha do método a utilizar é, realmente uma questão de bom senso (Minson, 1980, citado por Van Es, 1982).

A precisão de previsão necessária deve estar sempre de acordo com o cuidado na recolha das amostras e o poder de previsão do método analítico usado (Van Es, 1982).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Qualquer parcela de cultura de forragem exhibe uma variabilidade acentuada no que respeita à distribuição das várias espécies bem como uma densidade heterogénea, que consequentemente é reflectida no conteúdo dos fardos dela originada.

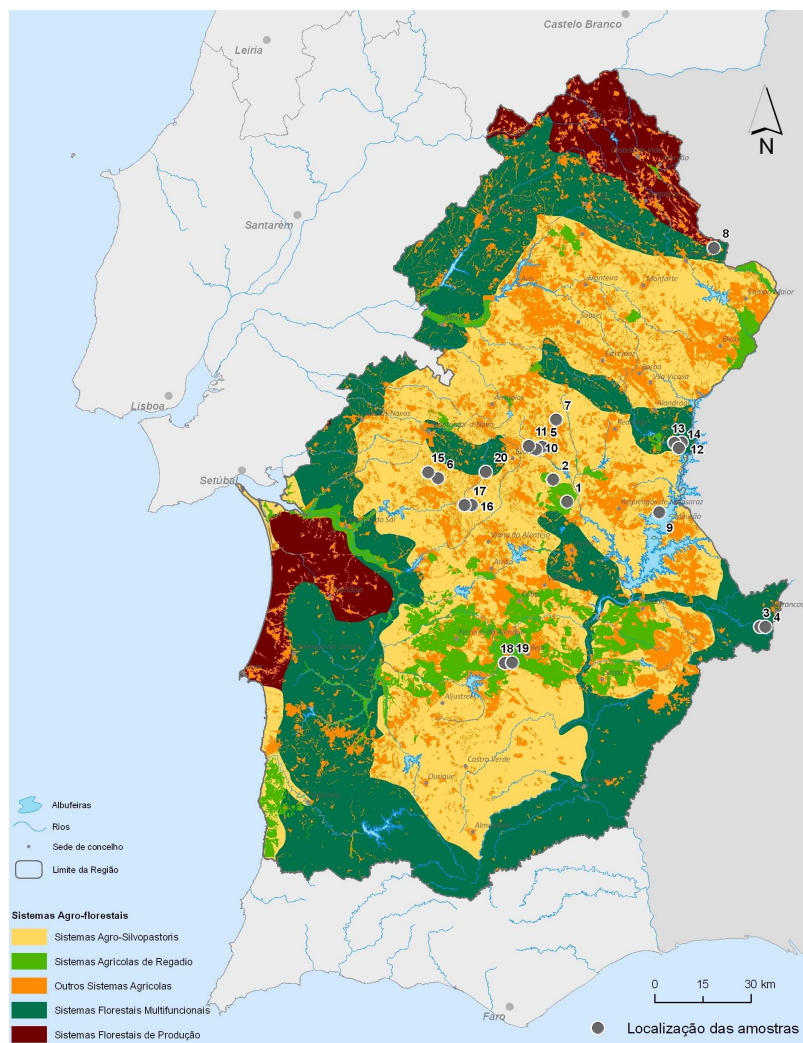
O delineamento experimental que sustentou este trabalho, teve por base uma parceria entre a Universidade de Évora e a Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo, através da sua Divisão de Produção Animal. Dentro do universo das explorações que essa estrutura acompanhava foram identificadas as explorações agrícolas com produção de feno no ano de 1985. Desse conjunto foram seleccionadas explorações agrícolas com produção de diferentes tipos de forragem, de modo a obter uma boa representatividade dos direntes tipos de feno produzidos na região. Foram visitadas 15 explorações do Alentejo (Figura 22. Esta figura encontra-se igualmente em anexo, em dimensão superior para melhor visualização.), pertencendo cerca de 75% das amostras ao Distrito de Évora (Figura 23).

As espécies vegetais encontradas foram as seguintes:

- aveia \* vicia \* cevada
- aveia \* vicia
- ervas espontâneas
- aveia \* tremocilha
- sorgo
- aveia

O período de recolha de amostras decorreu entre Maio e Outubro de 1985 e as deslocações eram realizadas conjuntamente com os técnicos da Divisão de Produção Animal de forma a não onorar o custo dos trabalhos. O material recolhido era processado no laboratório de nutrição animal da Universidade de Évora, na Herdade da Mitra, decorrendo no mesmo, todo o trabalho analítico envolvido na caracterização do valor nutritivo dos feno amostrados.

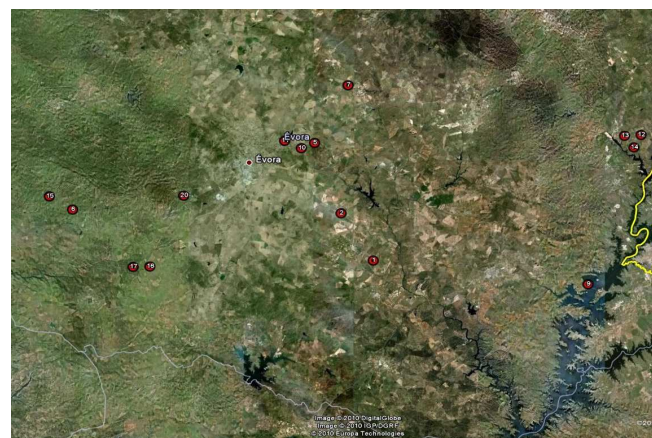
Como foi referido anteriormente, um dos objectivos deste trabalho era o de determinar qual a **técnica de amostragem** que permitiria a obtenção de uma amostra representativa das forragens estudadas, pelo que se procedeu também à comparação de 2 métodos de amostragem.



Fonte: Plano Regional de Ordenamento do Território do Alentejo, (2010) -Subsistema das Actividades Agro-florestais.

**Figura 22. Localização dos pontos de produção dos fenos amostrados**

Nº Amostra	Local	Tipo de feno
1	Cooperativa Vale Rico Homem	Aveia x Vicia x Cevada
2	Herdade dos Currais	Aveia x Vicia
3	Herdade da Contenda	Aveia x Vicia
4	Herdade da Contenda	Espontâneas
5	Cooperativa da Gramacha	Aveia x Tremocilha
6	Herdade Catarina Vaz	Aveia x Vicia x Cevada
7	Herdade do Paço	Aveia x Vicia
8	Herdade do Monte Manguens	Aveia x Vicia
9	Herdade do Xerês	Aveia x Vicia
10	Monte Novo dos Câmaras	Aveia
11	Quinta Nova do Ramires	Aveia x Vicia
12	Herdade de Santa Luzia	Espontâneas
13	Herdade de Santa Luzia	Sorgo
14	Herdade de Santa Luzia	Aveia x Tremocilha
15	Cooperativa do Escoural	Espontâneas
16	Herdade do Monte dos Ruivos	Espontâneas
17	Herdade do Monte dos Ruivos	Aveia
18	Herdade da Almocreva	Espontâneas
19	Herdade da Almocreva	Aveia x Vicia
20	Herdade da Mitra	Aveia x Vicia



Fonte: Google earth

**Figura 23. Pormenor de incidência da zona de maior concentração de amostragem - Concelho de Évora**

### **3.1 TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM**

#### **3.1.1 MÉTODO DAS AMOSTRAS COMPÓSITAS**

Em cada exploração eram escolhidos, ao acaso, 16 fardos de feno. De cada fardo, e do centro deste, era retirada uma “mão – cheia” de material que se guardava num saco plástico, comum às 16 sub-amstras. Feito isto, o saco era bem fechado e devidamente identificado com o código Fn em que:

F – feno de...

N – nº da exploração visitada (1 - 15)

#### **3.1.2 MÉTODO DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS**

Em cada exploração eram escolhidos 10 fardos ao acaso (podiam ou não incluir algum dos 16 anteriores). Do centro de cada um era retirada uma “mão-cheia” de material, que se guardava num saco de plástico individual a cada sub-amstra. Todos os sacos eram bem fechados e devidamente identificados com o código Fn/m, em que:

F – feno de...

N – nº de exploração visitada (1-15)

M – nº do fardo amostrado (1-10)

Para cada exploração, era preenchida uma ficha de identificação da amostra onde eram descritas todas as características físicas do material recolhido.

Após a recolha das amostras, estas eram transportadas, o mais rapidamente possível, para o laboratório afim de se proceder ao seu processamento. Em laboratório, procedia-se à moenda das amostras, num moinho de facas Thomas-Wiley, modelo 4, com um crivo de malha fina (1 mm). Depois da moenda, as amostras eram guardadas em sacos de plástico, devidamente selados e identificados, e armazenados em local ao abrigo da humidade.

### 3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para a determinação da composição química dos fenos amostrados, as técnicas utilizadas foram as seguintes:

- Teor da matéria seca a 100° C, determinado em estufa.
- Cinzas totais, determinadas por incineração, a 500°C, em mufla.
- Proteína bruta, pelo método de Kjeldahl.
- Digestibilidade *in vitro*, segundo o método de Tilley e Terry, modificado por Alexander, 1963.

Todas as amostras eram analisadas em duplicado, excepto para o caso da digestibilidade *in vitro*, que foram analisadas em triplicado.

Para o caso da proteína bruta, matéria seca e cinzas totais, sempre que a disparidade entre duplicados era superior a uma unidade percentual, procedíamos à repetição da análise. No caso da digestibilidade, a disparidade admitida entre réplicas era de 3 unidades percentuais.

Os valores tomados para o tratamento estatístico resultaram da média aritmética das réplicas, as quais foram feitas para a mesma amostra, em idênticas condições.

Durante o processamento das análises, todo o material e respectivas amostras eram devidamente identificadas com o código respectivo, a fim de evitar qualquer troca.

As amostras foram analisadas para os seguintes parâmetros:

- Teor em matéria seca (% MS)
- Teor em cinzas totais (% CT) na matéria seca
- Teor em proteína bruta (% PB) na matéria seca
- Digestibilidade “in-vitro”:
  - Da matéria seca (DMS %)
  - Da matéria orgânica (DMO %)
  - Da matéria orgânica na matéria seca (D %)

- Os cálculos da energia metabolizável na matéria seca foram realizados com base na digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca, segundo a seguinte equação (Barber *et al.*, 1984):

$$EM (Mj/Kg MS) = 0.158 D \% - 0.236$$

O estudo analítico decorreu no laboratório de Nutrição Animal da Universidade de Évora.

Durante a colheita das amostras e nas respectivas fichas, caracterizaram-se os fenos quanto ao seu aspecto (cor, presença ou ausência de fungos e relação folhas/caules).

A avaliação das forragens foi realizada com base na percentagem de proteína bruta (% PB), digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca D, e energia metabolizável (MJ/KG MS), por serem os parâmetros que mostram maior variação entre explorações, sendo também os que maior peso têm na eficiência de conversão alimentar.

### 3.2.1 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA SECA TOTAL

Após ter misturado muito bem toda a amostra que se encontrava dentro do saco plástico, foram pesadas aproximadamente 2 g para cadinhos de alumínio, previamente tarados e marcados com o número correspondente ao da amostra.

Depois de efectuadas as pesagens, os cadinhos eram introduzidos na estufa a 100° C durante uma noite. Na manhã seguinte, eram retirados da estufa e colocados num exsiccador, durante alguns minutos, após o que se procedia à sua pesagem.

- A matéria seca foi calculada através da fórmula:

$$\text{Matéria seca (\%)} = \frac{P2 - P0}{P1} * 100$$

P0 – tara do cadinho (g)

P1 – peso da amostra que foi introduzida no cadinho (g)

P2 – peso do cadinho e amostra após saída da estufa a 100°C (g)

Determinação das cinzas totais:

Depois de eliminada a humidade residual da amostra, os cadinhos de alumínio eram colocados numa bateria de placas de aquecimento, à base de resistência eléctricas, onde



a amostra sofria uma 1ª carbonização. Após esta operação, os cadinhos eram transportados, num exsiccador, para uma mufla, a 500° C onde ficavam, durante 3 horas. Terminada a incineração, a mufla era desligada, e aguardava-se que a temperatura baixasse aos 100°C. Seguidamente, os cadinhos eram colocados novamente no exsiccador e, após alguns minutos eram pesados.

■ **A cinza total foi calculada segundo a formula:**

$$\text{Cinza total (\%)} = \frac{P3 - P0}{P1 * F} * 100$$

P0 – tara do cadinho (g)

P1 – peso da amostra que foi introduzida no cadinho (g)

P3 – peso do cadinho + cinzas totais saídas da mufla (g)

F – factor de correcção

■ **Feitos os cálculos da % de cinzas totais, podemos calcular a % de matéria orgânica através da fórmula:**

$$\text{Matéria Orgânica (\%)} = 100 - \% \text{ cinzas totais}$$

### **3.2.2 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA BRUTA**

Para esta determinação foi seguido o método Kjeldahl.

Os reagentes utilizados para esta determinação foram:

1) Sal catalisador:

Sulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) – 700,0 g

Selénio (Se) – 0,5 g

2) Ácido Sulfúrico puro (96-98%)

3) Solução de hidróxido de sódio a 40%:

1,600 kg de soda caustica

3 l de água

Após arrefecimento da solução o volume foi completado a 4 l.

4) Solução padrão de ácido bórico

De cada vez, eram preparados 2 l de ácido bórico.

Dissolviam-se 80 g de ácido bórico em 1,5 l de água destilada, quente, e previamente fervida, num balão volumétrico de 2 l. Era introduzido um agitador magnético no balão,

que ajudava a dissolução e evitava a recristalização do ácido bórico. Aguardava-se um pouco até a temperatura baixar, e adicionávamos 20 ml de solução de verde bromocresol (20 mg de verde bromocresol dissolvido em álcool até perfazer o volume de 20 ml); e 14 ml de solução de vermelho de metilo (20 mg de vermelho de metilo, dissolvidos em álcool até perfazer 20 ml). Seguidamente adicionava-se água destilada, até perfazer os 2 l.

#### 5) Acido clorídrico 0,1 N, para titulação do material destilado

Foram feitos 2 l de solução. Adicionou-se 17,44 ml de acido clorídrico (HCl) a 35% a água destilada, para perfazer o volume de 2 l. Utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio (titrisol), à qual se juntou uma gota de vermelho metilo e verde bromocresol, para padronizar a solução anterior.

#### **Sequencia das operações:**

Pesava-se aproximadamente 1 g de amostra, e introduzia-se num tubo de digestão; adicionava-se uma colher calibrada de sal catalisador, +/- 7 g, misturava-se muito bem e juntava-se 12 ml de ácido sulfúrico. Em seguida os tubos eram colocados no digestor, previamente ligado, (que deveria estar à temperatura de 400° C), tapavam-se com chaminés, e deixava-se digerir durante, aproximadamente, 45 minutos. Depois de digerido todo o material, os tubos eram retirados do digestor e deixados a arrefecer, durante alguns minutos. Em seguida, retirava-se a chaminé e adicionavam-se, com cuidado, 75 ml de água destilada, em cada tubo, e agitava-se para evitar a precipitação do sulfato.

Seguia-se então, a destilação:

Após o destilador (tipo tecator ab) ter começado a funcionar, colocava-se um dos tubos na unidade de destilação, e um Erlenmeyer na plataforma colectora do destilador, com 25 ml de ácido bórico. Adicionava-se, então, o hidróxido de sódio através do doseador próprio, e iniciava-se a destilação. Após alguns segundos, o conteúdo do balão, que era vermelho devido ao ácido bórico, passava a verde.

Quando o Erlenmeyer contivesse um volume de +/- 125 ml de destilado, a destilação dessa amostra considerava-se concluída.

O tubo de digestão era retirado, tal como o balão Erlenmeyer, e repetia-se então o processo colocando outro tubo e outro balão no destilador.

Enquanto se processava a nova destilação, procedia-se à titulação do conteúdo do Erlenmeyer da destilação anterior, com ácido clorídrico 0,1 N. Considerava-se a amostra titulada quando a cor conseguida fosse o cinzento neutro, e registavam-se os ml de HCl 0,1 N gastos.

- **Após todas as amostras tituladas, procedia-se ao cálculo do azoto total segundo a fórmula:**

$$\text{Azoto total (\%)} = \frac{14,008 * \text{ml HCl } 0,1 \text{ N} * 0,1}{10 * P0 * F}$$

P0 – peso da amostra introduzida no tubo de digestão (g)  
F – factor de correcção

- **Calculou-se a proteína bruta pela fórmula:**

$$PB (\%) = \% N * 6.25$$

### **3.2.3 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO***

#### **Recolha do líquido ruminal**

Para o processo da digestibilidade *in vitro*, foi necessário possuir um animal dador de suco ruminal. Neste caso, utilizamos um carneiro fistulado, com uma cânula ruminal. Para a recolha do suco ruminal, utilizou-se também uma bomba de vácuo e balões aquecidos (kitasatos) a 40° C, para evitar o resfriamento repentino do suco ruminal, entre o momento da colheita e o da inoculação, e ainda um tubo de recolha, que era introduzido através da cânula. Para filtrar o suco ruminal, utilizamos um funil de porcelana, revestido de etamine dobrada em quatro partes, adaptando-se este funil a um outro balão colector. Todo este material era também aquecido a 40° C.

#### **Material utilizado**

Foram utilizados tubos de centrifuga de vidro, com rolha de borracha e válvula de Bunsen. Estes tubos têm as dimensões de 5cm de diâmetro por 12 cm de profundidade e uma capacidade para 150 ml.

Como material de filtração, utilizou-se um funil de porcelana pequeno, 12 cm de diâmetro, papel de filtro Whatman nº 54 isento de cinzas, de 15 cm de diâmetro, tarado e identificado com o número da amostra.

Foi utilizado um potenciômetro para medir os valores de pH de soluções utilizadas e das amostras durante a fermentação, material de dosagem do suco ruminal e solução tampão para cada tubo de centrifuga, uma balança eléctrica de precisão para pesagens, uma estufa para secagem (após filtração) dos resíduos não digeridos, um termómetro para medir frequentemente a temperatura da mistura a dosear, assim como a da água do banho-maria e uma garrafa de CO<sub>2</sub> com a finalidade de tornar a mistura-solução tampão mais suco ruminal anaeróbica.

### **Reagentes utilizados**

- Solução tampão ou saliva sintética de Mc Dougall:

- Bicarbonato de sódio (Na H CO<sub>3</sub>) -----9,8 g/lH<sub>2</sub>O destilada
- Hidrogeno fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>) -----3,69 g/lH<sub>2</sub>O destilada
- Cloreto de potássio (KCl) -----0,57 g/lH<sub>2</sub>O destilada
- Cloreto de sódio (Na Cl) -----0,47 g/lH<sub>2</sub>O destilada
- Sulfato de magnésio (Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) -----0,12 g/lH<sub>2</sub>O destilada
- Cloreto de cálcio (Ca Cl<sub>2</sub>) -----0,04 g/lH<sub>2</sub>O destilada

- Solução de pepsina:

A preparação da solução consistia na junção de 2 g de pepsina, DIFCO (1: 10.000) com H<sub>2</sub>O destilada aquecida a 38° C, até perfazer 1 l.

- Solução de ácido clorídrico a 50% (V/V)

### **Sequência das operações**

O primeiro passo dado foi a revisão de todo o material necessário, bem como a sua limpeza e ensaio de funcionalidade.

Após tudo pronto, iniciou-se o trabalho pelas pesagens de 0,5 g de amostra, em triplicado, incluindo as amostras padrão de digestibilidade *in vivo* conhecida, - uma com

um valor de digestibilidade *in vivo* elevado (feno de aveia \* vicia, com 65% de digestibilidade da matéria seca) e outra com um valor baixo (feno de aveia \* vicia, com 42% de digestibilidade da matéria seca).

A amostra pesada era introduzida num tubo de centrifuga, numerado com o número correspondente à amostra. Paralelamente, era feito o registo do peso da amostra, bem como a sua identificação e número do tubo correspondente.

Foi feita a correcção de todos os pesos das amostras para a matéria seca total, previamente determinada.

Foram utilizados 3 tubos em branco, por cada 42 tubos com amostras a analisar.

Seguidamente, preparou-se solução tampão – saliva de Mc Dougall. Esta solução era aquecida em banho-maria a 39°C e saturada de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 15 minutos. Depois disso, com o auxílio do aparelho de pH, verificou-se qual o pH da referida solução. O valor encontrado estava compreendido entre 7,1 e 7,2.

Depois do material aquecido, procedia-se à recolha do suco ruminal e à sua filtração. Todas estas operações decorreram o mais rapidamente possível.

Após o suco filtrado, era medida a quantidade necessária para as inoculações a efectuar nesse dia. A proporção de suco ruminal, relativamente à de solução tampão, era de 1:4. Logo de seguida, essa quantidade era misturada com a solução tampão que estava na tina aquecida, e continuava-se a borbulhar a mistura com CO<sub>2</sub>. Passados alguns minutos, tempo necessário para que se desse uma boa homogeneização da mistura, iniciava-se a inoculação de cada tubo, com 50 ml dessa mistura. Após cada inoculação, os tubos eram, de imediato, tapados com rolhas de borracha, para evitar entrada de ar para o seu interior. Depois de rolhados, os tubos eram colocados num suporte, em “banho-maria” a 39° C. Os tubos permaneciam assim durante 48 horas, sendo agitados 3 vezes ao dia, com o cuidado de evitar que algumas partículas se colassem às paredes do tubo, ficando fora da solução. Findas 48 horas os tubos eram retirados do “banho-maria”, um por um, e acidificava-se o seu conteúdo adicionando lentamente 2,5 ml de HCl a 50%, deixando a solução com pH entre 1.3 e 1.5. Depois de acidificado o meio, adicionámos 50 ml de solução de pepsina a cada tubo, voltando a colocá-los no banho, por mais 24 horas, agitando-se com cuidado os tubos, 3 vezes o dia.

A fase seguinte era a filtração.

Após o material preparado e a bomba de vácuo ligada, deitávamos o conteúdo do tubo de papel de filtro previamente tarado, lavando com água destilada bem quente as paredes do tubo e o resíduo, até a água de lavagem aparecer incolor, o que equivalia a cerca de 3 lavagens do resíduo, tendo o cuidado de efectuar o mesmo numero de lavagens para todas as amostras.

No final de cada filtração, o papel de filtro era retirado do interior do funil e dobrado, de forma que não houvesse perdas de material. Quando todas as filtrações estavam terminadas, os papéis de filtro, que continham o resíduo, eram colocados numa estufa a 100° C, durante uma noite, para determinação da matéria seca do resíduo. No dia seguinte eram retirados da estufa, para um exsiccador, 3 papéis de cada vez, e eram pesados. O peso era registado numa folha própria, ao lado do código e número da respectiva amostra.

Para determinação da matéria orgânica do resíduo, cada papel de filtro, com respectiva identificação, era depois dobrado e colocado num cadinho de alumínio previamente tarado, registado o número do cadinho que correspondia a cada papel de filtro, sendo posteriormente regado com etanol e incinerado. Depois de queimado o material do interior dos cadinhos, estes eram introduzidos na mufla a 500° C, durante 3 horas. Finalmente eram retirados da mufla para um exsiccador, pesado, e registado o seu peso.

Após os cálculos intermédios realizados, foi calculada a:

■ **Digestibilidade da matéria seca**, através da fórmula:

$$\text{Digestibilidade da M.S. (\%)} = \frac{\text{Matéria seca da amostra} - \text{Matéria seca do resíduo}}{\text{Matéria seca da amostra}}$$

■ **Digestibilidade da matéria orgânica**, através da formula:

$$\text{Digestibilidade da M.S. (\%)} = \frac{\text{Matéria orgânica da amostra} - \text{Matéria orgânica do resíduo}}{\text{Matéria orgânica da amostra}}$$

■ **Digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca**, através da fórmula:

$$\text{Digestibilidade da M.S. (\%)} = \frac{\text{Matéria orgânica da amostra} - \text{Matéria orgânica do resíduo}}{\text{Matéria seca da amostra}}$$

### 3.2.4 CALCULO DO VALOR DA ENERGIA METABOLIZÁVEL

A energia metabolizável de cada amostra foi posteriormente calculada, segundo a equação de regressão proposta para os fenos por Barber *et al.*, (1984), e tendo por base os valores calculados da digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica na matéria seca (D%), que resultou na média dos 2 valores do triplicado, que eram mais próximos um do outro.

$$\text{Energia metabolizavel (Mj/Kg Ms)} = 0.158 \text{ D \%} - 0.236$$

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise de variância para um desenho experimental de blocos casualizados em arranjo hierárquico (Hicks, 1982).

Foi calculada a variância entre fenos amostrados, a partir de 10 amostras individuais (10 fardos), e a variância a partir da amostra compósita de 16 amostras individuais. A diferença entre as duas variâncias foi testada através de um teste F.

De forma a calcular a repetibilidade dos valores encontrados para os fardos, dentro de cada amostra, foi empregue um modelo estatístico que nos permitiu calcular o efeito dos fenos amostrados, o efeito dos fardos dentro da amostra, e o efeito dos duplicados dentro de cada fardo, considerados como elementos randomizados. Isto permitiu calcular os componentes da variância dos duplicados ( $\sigma^2$ ), fardos dentro da amostra ( $\sigma^2 F$ ), e a variância dos fenos ( $\sigma^2 E$ ).

A razão entre a variância dos fenos e a soma da variância dos fardos, mais a variância dos fenos, é a repetibilidade do parâmetro medido nos fardos.

$$r = \frac{\sigma^2 E}{\sigma^2 F + \sigma^2 E}$$

De modo a calcular o numero de fardos a amostrar por exploração, que conduziria a uma melhoria da repetibilidade, usou-se a fórmula  $nr/[1 + (n - 1) r]$  (Martin, 1985).

O parâmetro utilizado para medir a repetibilidade entre fardos foi a proteína bruta, por ser o parâmetro onde se encontrou maior variação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 VALOR NUTRITIVO DOS FENOS ANALISADOS

No Quadro 10 exprimem-se os resultados da composição química dos fenos analisados.

**Quadro 10. Teores de matéria seca (MS), cinzas totais (CT), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca (D) e energia metabolizável (EM) encontrados nos fenos analisados.**

Nº da Amostra	FENO	MS	CT	MO	PB	D	EM
1	Aveia x Vicia x Cevada	89,51	5,75	94,25	4,97	55,30	8,50
2	Aveia x Vicia	91,86	6,89	93,11	6,11	63,10	9,73
3	Aveia x Vicia	92,18	6,55	93,45	6,98	55,89	8,59
4	Espontâneas	93,22	6,76	93,24	4,97	56,51	8,69
5	Aveia x Tremocilha	94,30	5,31	94,69	6,50	59,69	9,20
6	Aveia x Vicia x Cevada	91,28	5,42	94,58	7,16	52,03	7,98
7	Aveia x Vicia	90,35	8,74	91,26	6,28	49,84	7,64
8	Aveia x Vicia	90,55	5,59	94,41	7,06	50,48	7,74
9	Aveia x Vicia	91,17	6,57	93,43	4,92	56,61	8,71
10	Aveia	91,51	5,67	94,33	5,67	53,47	8,21
11	Aveia x Vicia	92,78	6,40	93,60	8,31	48,63	7,45
12	Espontâneas	93,15	6,81	93,19	6,98	43,54	6,64
13	Sorgo	91,72	5,39	94,61	7,72	58,86	9,06
14	Aveia x Tremocilha	92,04	5,53	94,47	6,59	55,41	8,52
15	Espontâneas	91,24	6,08	93,92	8,25	48,89	7,49
16	Espontâneas	89,54	8,58	91,42	13,83	55,17	8,48
17	Aveia	91,41	8,13	91,87	6,24	51,01	7,82
18	Espontâneas	91,64	5,40	94,60	6,06	56,89	8,75
19	Aveia x Vicia	92,09	5,76	94,24	7,51	54,87	8,43
20	Aveia x Vicia	90,27	5,52	94,48	7,33	46,93	7,04

MS - matéria seca, expressa em %

CT - cinza total, expressa em %, na matéria seca

PB - proteína bruta, expressa em %, na matéria seca

D - digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca, expressa em %

EM - energia metabolizável, expressa em MJ/Kg de matéria seca

NOTA: A percentagem de MS, CT e PB, encontrada para cada feno amostrado, resulta da análise laboratorial de uma amostra compósita de 16 fardos, bem como valores D, que serviram de base para os cálculos da energia metabolizável (EM).

Da análise do Quadro 10, pode observar-se que os teores de humidade encontrados nestes fenos são inferiores a 10% do total dos constituintes do alimento.



A percentagem de CT oscila entre 5,31 e 8,74, pertencendo o teor mais baixo a um feno de consociação aveia\*vícia\*cevada e o teor mais alto a um feno de consociação aveia\*vícia.

Na PB é de salientar que o valor mais elevado que se observa (13,83) é de um feno de espontâneas, e que o teor mínimo (4,92) apresenta-se para um feno de consociação aveia\*vícia. Três dos fenos amostrados revelaram teores de PB inferiores a 6% do total dos constituintes da MS, e apenas num se encontrou teor superior a 12%.

Quando ao teor energético, os mesmos fenos acusam valores que variam entre os 6,6 e 9,7 MJ/Kg de matéria seca. Neste parâmetro, ao inverso da PB, o valor máximo (9,73) apresenta-se para um feno de consociação aveia\*vícia, e o valor mínimo (6,64) para um feno de espontânea.

No Quadro 11, apresenta-se a composição química e o valor nutritivo médio em função dos diversos tipos de fenos amostrados.

**Quadro 11. Teores médios de MS, MO, PB, D e EM, para os diferentes tipos de feno amostrados.**

FENO	MS %	MO %	PB %	D %	EM MJ/Kg MS
Aveia x Vícia	91,41	93,50	6,81	53,29	8,17
Aveia x Vícia x Cevada	90,40	94,41	6,07	53,67	8,24
Espontâneas	91,76	93,27	8,02	52,20	8,01
Aveia x Tremocilha	93,17	94,58	6,55	57,55	8,86
Aveia	91,46	93,10	5,96	52,24	8,02
Sorgo	91,72	94,61	7,72	58,86	9,06
Média Global	91,65	93,91	6,86	54,64	8,39
Desvio Padrão	0,89	0,70	0,85	2,85	0,45

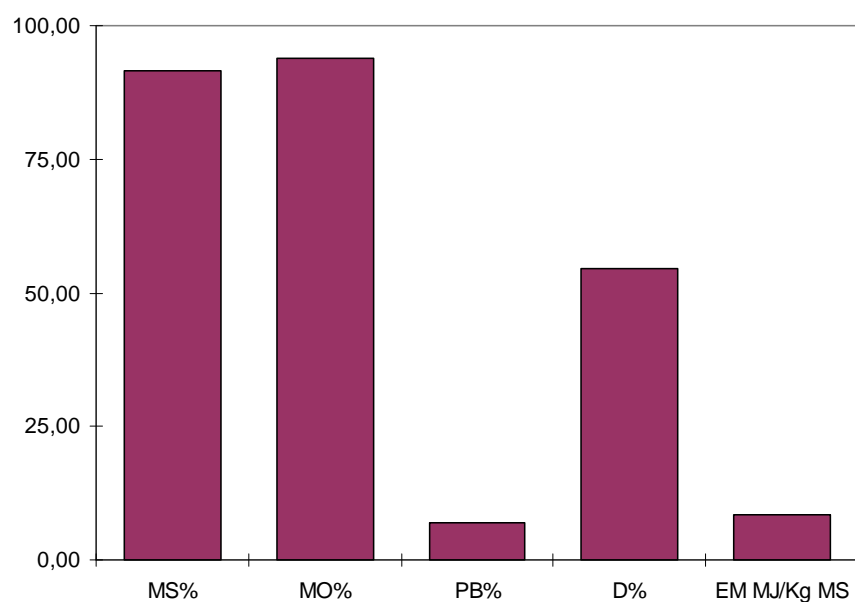
MS - matéria seca, expressa em %.

MO – matéria orgânica, expressa em %, na matéria seca.

PB – proteína bruta, expressa em %, na matéria seca.

D – digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca, expressa em %.

EM – energia metabolizável, expressa em MJ/Kg MS.



**Figura 24.** Teores médios Globais de MS, MO, PB, D e EM, para os fenos amostrados.

**Quadro 12.** Valores médios, extremos, e desvio padrão dos resultados das análises das 20 amostras compósitas de fenos e respectiva significância estatística.

	$\bar{x}$	$\sigma$	EXTREMOS		SIGNIFICÂNCIA
			máx	mín	
Matéria seca (MS %)	91,59	±1,22	94,30	89,51	**
Cinzas totais (CT %)	6,34	±1,07	8,74	5,31	**
Proteína bruta (PB %)	6,97	±1,90	13,83	4,92	**
Energia metabolizável Mj/Kg MS	8,23	±0,76	9,73	6,64	**

—

$\bar{x}$  - Média

$\sigma$  - Desvio padrão

Max – Valor máximo encontrado

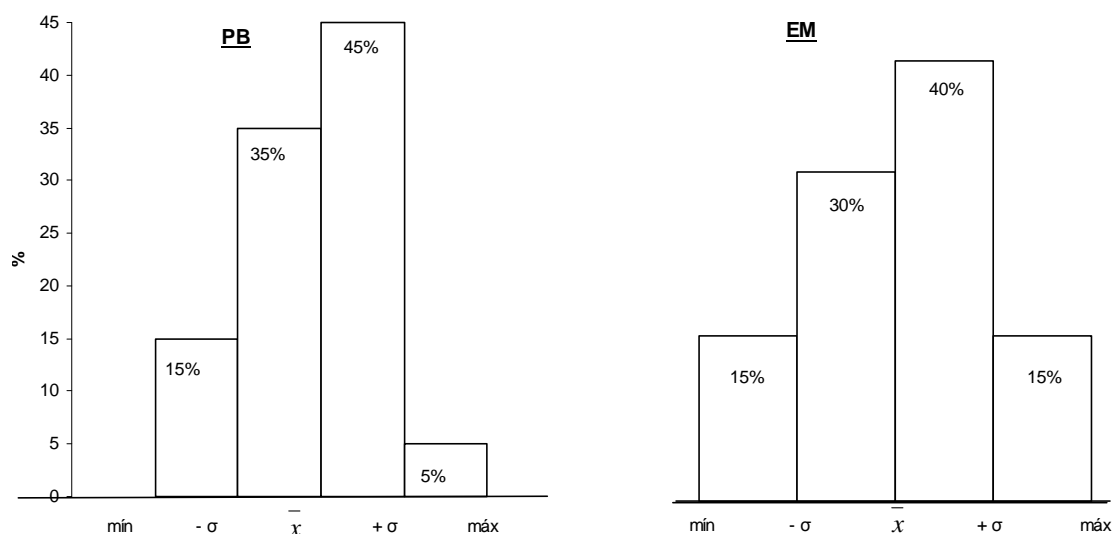
Min – Valor mínimo encontrado

\* - significativo para  $P < 0,05$

\*\* - significativo para  $P < 0,01$

\*\*\* - significativo para  $P < 0,001$

São significativas ( $P < 0,001$ ) as diferenças entre fenos amostrados para qualquer dos parâmetros analisados.



**Figura 25. Distribuição das percentagens das amostras de fenos, por conteúdo em proteína bruta e energia metabolizável, em intervalos de classe ( $\bar{x}$ , média;  $\sigma$ , desvio padrão; min, valor mínimo; max, valor máximo).**

Como se pode observar nos histogramas da Figura 25, 50% das amostras de fenos tem uma percentagem de proteína bruta inferior à média da totalidade das amostras, e a maior parte possuem valores de PB compreendidos no intervalo  $[\bar{x}, +\sigma]$  ou seja entre 6,97% e 8,87%.

Quanto à energia metabolizável, 55% das amostras possuem valor energético superior à média da totalidade. Tal como para a PB, também no caso da EM a maior percentagem de amostras tem um valor energético compreendido no intervalo  $[\bar{x}, +\sigma]$ , ou seja entre 8,23 MJ/kg de matéria seca e 8,99 MJ/kg de matéria seca.

Apenas 5% das amostras apresentam valores muito superiores à média no que se refere ao teor de PB, sendo a percentagem um pouco mais elevada (15%) em relação ao valor da EM.

Pode afirmar-se que, regra geral, os fenos produzidos na região, são de má qualidade, atendendo a que possuem teores de PB e valores de digestibilidade muito baixos.

Registaram-se contudo diferenças significativas ( $P \leq 0,01$ ) entre fardos para todos os fenos amostrados, no que respeita ao seu teor em proteína bruta. Almeida *et al.* (1987) referem também que os valores encontrados para o 2º ano de estudo da problemática da qualidade dos fenos no Alentejo voltou a confirmar a baixa qualidade destes, adiantando que as causas prováveis para esta má qualidade se devem a uma tendência generalizada

para efectuar épocas tardias de corte e um abundante desfolhamento originado pelas tecnologias de fenação praticadas.

Serrano, (2002), considera as perdas físicas (mecânicas ou por lixiviação), o principal factor a influenciar a qualidade final dos fenos contribuindo para uma descida do valor nutricional à medida que essas perdas se forem acentuando.

Os teores de MS, MO, D e EM, obtidos para as amostras compósitas de cada uma das 15 explorações amostradas, encontram-se resumidos no Quadro 10.

Os valores registados por outros autores portugueses e estrangeiros, são apresentados no Quadro 13.

Os valores encontrados para aveia\*vicia são concordantes com valores referidos por outros autores (Serrano, 1978) e (Almeida, 1982b), para a proteína bruta (PB), sendo regra geral baixos. Os valores obtidos para a digestibilidade (D) manifestam uma qualidade mediana.

Os valores médios alcançados são nitidamente inferiores aos verificados por Saxena *et al.* (1973); INRA, (1978), McDonald *et al.* (1975) e Amella *et al.* (1982).

Se compararmos o teor médio da PB, encontrado para os fenos de consociação de aveia\*vicia (6,81) com os fenos de aveia (5,96) e de vicia (16,7) (Serrano, 1978) verifica-se que os valores dos fenos amostrados se encontram mais próximos da aveia, o que poderá indicar que a contribuição da leguminosa terá sido muito pequena.

Quanto ao conteúdo energético, os teores encontrados são igualmente baixos, mas semelhantes aos referidos por autores franceses (INRA, 1978) e (Almeida, 1982b). Para os fenos de aveia\*vicia, aveia\*vicia\*cevada, espontâneas, aveia\*tremocilha e aveia, são respectivamente, (8,17); (8,24); (8,01); (8,86) e (8,02) MJ/Kg de matéria seca.

Observando os valores D deste trabalho, apresentados no Quadro 11 concluímos que a média, para os fenos de aveia\*vicia, aveia\*vicia\*cevada, espontâneas, aveia\*tremocilha e aveia, são respectivamente (53,3%); (53,7%); (52,2%); (57,6%) e (52,2%). Nenhuma das médias encontradas ultrapassou os 60%, e 50% dos fenos amostrados não atingem o valor D de 55%.

Esses valores não diferem dos encontrados por Serrano (1978); Ferreira *et al.* (1981) Amella *et al.* (1982), e são igualmente baixos.

No que diz respeito aos teores de MS, as médias encontradas para os diferentes fenos, são sempre superiores a 90%, o que, segundo alguns autores, são valores elevados Raymond *et al.*, 1977).

**Quadro 13. Composição química e valor nutritivo de fenos produzidos em Espanha, França e Índia, para comparação com fenos nacionais.**

FENO		MS	MO	PB	D	DMS	EM	REFERÊNCIA
		%					Mj/Kg MS	
Espontâneas (1)		86,29	92,00	9,67	58			Amalla <i>et al</i> (1982)
A x V de 20 a 50% vicia	Corte Precoce	79,00	89,70	10,40			9,50	INRA (1978)
	Corte Tardio	82,40	90,10	9,9			8,66	
A x V 20% de vicia	Corte Precoce	81,00	87,00	12,9			9,58	
	Corte Tardio	86,20	91,10	6,9			8,33	
Aveia		85,00	94,3	6,8			7,8	McDonald, <i>et al.</i> (1975)
A x V			86,06	12,21				Saxena, <i>et al.</i> (1973)
A x V	20/5/77	90,00		7,55	53,45			Serrano (1978)
	22/6/77	91,10		5,85	43,40			
Aveia	20/5/77	90,15		5,55	50,40			
	22/6/77	91,40		4,30	39,10			
Vicia	20/5/77	89,10		16,50	59,75			
	22/6/77	90,20		16,85	49,85			
A x V		91,00		6,60			6,5	Almeida (1982b)
A x T				4,00			4,5	
A x T				16,60			10,5	
A x V				5,50			7,5	
Erva de Prado (2)				7,90		55,60		Ferreira, <i>et al.</i> (1981)
Erva de Prado (3)				7,60		54,60		
Tremocilha		86,7	93,5	7,00			8,62	Abreu <i>et al.</i> (1982)

(1) Valores médios que resultam da análise de 69 amostras de feno de espontâneas, recolhidos em 1977-78.

(2) Valores médios que resultam da análise de 19 amostras de feno de erva dos prados de lameiro, do Nordeste de Portugal (prados onde foi realizada uma fertilização e aplicados correctivos).

(3) Valores médios que resultam da análise de 19 amostras de feno de erva dos prados de lameiro, do Nordeste de Portugal. Estes autores referem que, para os fenos que amostraram o valor D, está, em geral 5 a 6 unidades abaixo da digestibilidade da MS (DMS).

**MS** - Matéria seca, expressa em %

**MO** - Matéria orgânica, expressa em %, na matéria seca.

**PB** - Proteína bruta, expressa em %, na matéria seca.

**D** - Digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca, expressa em %.

**DMS** - Digestibilidade da matéria seca, expressa em %.

**EM** - Energia metabolizável, expressa em Mj/Kg de matéria seca.

Dos resultados da análise mineral obtivemos apenas teores totais; não sabemos, por isso, qual é a concentração dos diferentes elementos. Seria útil tê-los calculado, com o objectivo de analisar até que ponto esses teores conseguiriam satisfazer as necessidades alimentares dos animais.

Se tentarmos caracterizar o valor nutritivo dos fenos amostrados, segundo a proposta de escalas de classificação de fenos para o nosso país, elaborada por Rhykerd *et al.*, (1982), podemos ver que estes recaem na classificação de fenos de má qualidade, no que se refere aos teores de PB, mas se atendermos ao valor da digestibilidade da MS (DMS%), os fenos amostrados poderiam classificar-se na qualidade média, uma vez que o valor D está, em geral, 5 a 6 unidades abaixo da digestibilidade da MS (Ferreira *et al.*, 1982) A grande maioria das amostras apresentava teores de PB inferiores a 9%, mas os valores da DMS são superiores a 45%. Quanto à cor, os nossos fenos apresentaram em média, a tonalidade amarela.

**Quadro 14. Proposta de uma escala de classificação de fenos (Rhykerd *et al.*, 1982)**

Qualidade do feno	Descrição Física		Análise Laboratorial	
	Cor (tonal.méd.)	Observações	PB (1)	DMS (2)
			%	%
Boa	Verde	Ausência de fungos, terra, infestantes, maus cheiros, etc.	12	60
Média	Castanha		9-12	45-60
Má	Amarela		9	45

(1) Proteína bruta, % da matéria seca

(2) Digestibilidade da matéria seca. *in vitro*.

Parece existir um desequilíbrio de energia/proteína, na composição destes fenos. Tal facto foi igualmente observado por Amella *et al.*, (1982) para os fenos amostrados na região de Guipuzcoa (Espanha).

Muitos factores podem afectar a qualidade dos fenos.

Assim, por exemplo:

- - Alterações mecânicas
- - Condições climáticas
- - Época de corte
- - Acção das enzimas vegetais
- - Acção dos microrganismos
- - Oxidação
- - N° de dias de permanência no campo
- - Espécies e variedades vegetais que compõem a forragem
- - Relação gramínea/leguminosa
- - Tecnologia de fenação
- - Tipos de solo
- - Adubação

podem ter sido alguns dos factores responsáveis pelo baixo valor nutritivo dos fenos recolhidos, e também pela enorme variação encontrada nos valores entre explorações e entre fardos de cada exploração. O trabalho de Pinheiro e Peça (2004), vem confirmar para alguns destes factores a sua influência no valor nutritivo final em forragens cultivadas na região Mediterrânica pois refere que as condições ambientais, o processo de colheita da forragem ou o processo de secagem são factores responsáveis pela heterogeneidade da forragem conservada. Almeida *et al.*, (1987) referem que a tardia época de corte e o excessivo desfolhamento resultante das tecnologias de fenação usualmente praticadas são responsáveis pela baixa qualidade dos fenos produzidos no Alentejo.

As diferentes datas de corte verificadas, as diferentes condições climáticas que ocorrem durante todo o processo de fenação, os diferentes tipos de solo onde se desenvolveram as forragens, as diferentes tecnologias de fenação praticadas, as diferentes adubações aplicadas, as diferentes espécies e variedades utilizadas e diferentes relações proporcionais de gramíneas/leguminosa, poderão, talvez, ser a explicação para as diferenças significativas, encontradas nos fenos amostrados. Reid (1973, citado por Van Soest, 1982); Raymond *et al.*, (1977); McDonald *et al.*, (1975); Serrano (1981); Ferreira *et al.*, (1981); Moreira (1982); Amella *et al.*, (1982), afirmam ser de grande

importância a escolha da época ideal de corte, visando conciliar a quantidade produzida com a qualidade da produção, de forma a obter as melhores produções de energia e proteína, por unidade de superfície.

Com efeito, e segundo Serrano (1981), o valor nutritivo de qualquer forragem aumenta até à fase da floração, durante esse período mantém-se constante, após o que decresce continuamente até a maturação do grão, no caso de sementes gradadas, ou até à secagem completa, em plantas de sementes miúdas ou deiscentes. Assim, o autor refere que a altura óptima de corte situa-se, para as leguminosas, durante a floração e, para as gramíneas, durante o “emborrachamento”, e que, para as condições climáticas, 80% das forragens alcançam esse estado durante o mês de Abril, mais concretamente na segunda quinzena. Daí que o ideal seria fazer feno em Abril. No entanto, refira-se que a época mais favorável de corte depende do objectivo que se pretende atingir: segundo Almeida (não publicado), se se pretender obter elevado potencial produtivo e elevada digestibilidade, o corte deve realizar-se cedo, dependendo então da espécie forrageira em causa, mas se, por outro lado, o objectivo for a obtenção de maior produção de MS por hectare, então o corte deve fazer-se numa fase mais tardia; no entanto, as elevadas perdas de campo em PB e MO não são compensadas pelo acréscimo na produção de MS.

Ao realizar-se a amostragem, foi constatado que os agricultores da região tendem a efectuar cortes tardios (fins de Maio e Junho).

McDonald *et al.*, (1975) apontam que, após o corte da forragem, as principais perdas de nutrientes se dão na facção dos hidratos de carbono solúveis, devido à respiração aeróbia, na qual os açúcares se oxidam, dando dióxido de carbono e água. Como resultado, há uma maior concentração dos constituintes da parede celular, especialmente celulose e lenhina, o que origina que a matéria seca do feno tenha um conteúdo em fibra bruta superior à da forragem verde. No entanto a fracção proteica pode também alterar-se, por acção das enzimas vegetais. Logo após o corte formam-se aminoácidos como consequência da proteólise. Esta alteração não afecta o conteúdo em proteína bruta, a não ser que se percam compostos solúveis de azoto, por lavagem.

Ainda McDonald *et al.*, (1975), afirmam que o conteúdo em proteína bruta do feno não constitui, em si, um bom guia do valor nutritivo, já que o teor tanto pode permanecer inalterado, como aumentar, em virtude da perda de outros nutrientes.



As perdas por lavagem podem também dar-se nas fracções dos hidratos de carbono solúveis, açúcares e compostos azotados e, como resultado, aumentar a proporção dos constituintes da parede celular, logo a fibra bruta. Igualmente por acção da pluviosidade, a actividade enzimática no interior das células é prolongada, originando aumento das perdas de nutrientes solúveis e favorecendo o aparecimento e evolução de fungos resultando num feno de qualidade inferior.

O consumo de nutrientes por parte dos animais, varia em função da digestibilidade do alimento. Tal digestibilidade está relacionada com o estado vegetativo e ligada, fundamentalmente, à razão folhas/caules (Raymond *et al.*, 1977). Com forragens de qualidade média ou má ( $D < 65$ ), os factores físicos predominam sobre os metabólicos, no controlo da ingestão (Balch e Campling, 1962).

Os baixos valores D encontrados, (53,7), sugerem baixas ingestões, e a sua inadequação à alimentação de animais em fase de produção (carne ou leite). De facto, os valores nutritivos observados não são muito superiores aos das palhas de cereais (Quadros 10 e 14).

Quanto mais elevado for o valor da digestibilidade, menor será o tempo de permanência no rumen e, conseqüentemente, maior será o nível de ingestão. Inversamente, os alimentos de baixa digestibilidade no rumen, determinam elevados tempos de permanência e, como resultado, menor nível de ingestão (Raymond *et al.*, 1977).

Serrano (2002) aponta a desfoliação como a principal perda mecânica nas forragens conservadas. Esta, traduz-se inevitavelmente, por fortes quebras na digestibilidade e proteína do material conservado, e conseqüentemente, baixo valor nutritivo e alimentar.

O valor nutritivo das forragens está também relacionado com a sua composição química e alguns índices de qualidade têm sido propostos nesta base. Por exemplo, nos EUA os níveis standards para fenos de luzerna estão relacionados, designadamente, com os conteúdos de proteína bruta e as fracções em fibras (Caballero 1993 citado por Caballero *et al.*, 1996). O autor refere que na região do Mediterrânico muitos agricultores cultivam forragens de consociação de ervilhacas com cereal, contudo, não existem valores padronizados para a qualidade dos fenos produzidos com vista à sua comercialização. Estes autores, baseando-se num critério químico, propuseram um mínimo de 50 % de conteúdo de ervilhaca nos fardos (a sementeira deve ter uma proporção de ervilhaca/aveia de 70:30 a 90:10) como objectivo para se alcançar uma

boa qualidade do feno. Caballero *et al.* (1996) apontam ter sido observado que as diferenças em composição botânica contribuíam em menor grau para variações das frações da fibra, em oposição a variações em proteína bruta.

**Quadro 15. Composição química, digestibilidade da matéria orgânica e valor energético de alguns alimentos fibrosos típicos.**

ALIMENTO	PB	FB	"NDF"	"ADF"	"ADL"	DMO	EM	REFERÊNCIA
	%						Mj/Kg MS	
Palhas:								
Arroz	4,0	38	79	53	20	40	6,0	Van Soest (1973)
Aveia	4,0	40	72	50	13	48	6,9	
Centeio	3,6	45	86	57	13	42	6,3	Sequeira e Dias da Silva (1978)
Cevada	4,2	42	80	58	9	43	6,5	Van Soest (1973)
Milho	5,9	42	67	39	11	51	7,6	"
Trigo	3,0	48	83	53	14	39	5,9	"
Casca de arroz	3,0	45	86	72	33	15	2,3	"
Feno azevém	10,2	32	56	36	5	62	9,3	MAFF (1975)
Feno Aveia x Vicia (1)	5,5	39					7,1	EZN
Feno Aveia x Vicia (2)	6,6		63	38	6,5	50	6,5	U.E.
feno Aveia x Tremocilha	4,0		68	43	6,7	35	4,5	U.E.
Feno Aveia x Tremocilha	16,6					69	10,5	U.E.

Fonte: Almeida, não publicado.

(1) Média 221 amostras, vários anos

(2) Média 14 amostras, 3 anos

Esta análise vem reforçar a ideia da grande penalização ao nível da qualidade, sempre que ocorrem perdas físicas significativas em fenos à base de forragens consociadas de gramíneas e leguminosas, pois essas perdas ocorrem sobretudo na leguminosa, por perda de folhas, baixando o índice proteico e de digestibilidade do feno (Serrano, 2002).

Lithourgidis *et al.* (2006) descrevem que são usadas extensivamente na região mediterrânica as misturas de leguminosas anuais para forragem com cereais de inverno, para a produção de forragem. Estes autores investigaram a produção e a qualidade da forragem, assim como, o efeito de consociação na taxa de crescimento de três espécies (monoculturas de ervilhaca comum *Vicia sativa L.*, aveia *Avena sativa L.* e tritcale

*Triticosecale Wittmack* e as misturas de ervilhaca com cada um dos cereais anteriores). Estes estudos demonstraram que uma mistura de ervilhaca/aveia na razão à sementeira de 65:35 permitiu atingir a produção mais elevada de forragem e respectivo conteúdo em proteína, comparativamente com outras misturas estudadas.

Caballero *et al.* (1995), estudaram as produções obtidas com diferentes rácios de ervilhaca/aveia à sementeira nas proporções 100:0, 90:10; 80:20, 70:30 e 60:40 Estes autores sugerem que uma adequada qualidade da forragem é obtida numa proporção de 10-20% de sementes de aveia na mistura.

Pinheiro e Peça (2004), também estudaram a compatibilidade das misturas de 3 variedades de aveias e duas espécies de ervilhaca, na produção de forragem e respectiva qualidade. A cultura de misturas de aveia com ervilhaca foi vantajosa para aumentar a qualidade da forragem. O crescimento da aveia numa mistura com ervilhaca aumentou significativamente a qualidade da forragem e verificou-se a ingestão voluntária preferencial da mistura por parte dos animais. Esta conclusão parece contrariar a opinião de outros autores que referem, que são os elevados teores de leguminosa que originam fenos de melhor qualidade

Mpairwe *et al.* (2003a,b), examinaram o efeito da suplementação da dieta de vacas com fenos “lablab” (forragem leguminosa com elevado valor proteico, nativa do Uganda), com forragens de cereais/leguminosas (milho-lablab) ou aveia-ervilhaca, na ingestão alimentar e na produção e composição do leite de vacas. A suplementação de fenos “lablab” aumentou significativamente o total de matéria seca ingerida e digerida comparativamente às dietas não suplementadas. O suplemento com feno “lablab” aumentou a produção de leite. Porém, a concentração de gordura no leite, proteína, e sólidos totais eram semelhantes nas dietas suplementadas com fenos milho-lablab e aveia-ervilhaca.

É imperativo que se produzam fenos de melhor qualidade no Alentejo, se pretendermos aumentar o potencial produtivo dos rebanhos e diminuir a contribuição do concentrado nas dietas, já que, nas nossas condições, a produção de pastagem de sequeiro apresenta uma distribuição irregular.

No que diz respeito à produção de feno nas regiões amostradas, a época tardia de corte associada a uma tecnologia de fenação provavelmente inadequada, poderão ter constituído os principais factores responsáveis pela má qualidade encontrada.

Em virtude de serem inúmeros os factores que podem influenciar o valor nutritivo, e verificando-se existirem grandes variações entre explorações, é importante definir um bom método de amostragem de fenos.

A evolução verificada nas técnicas de análise laboratorial ao longo dos anos que já decorreram após o trabalho inicial, no que respeita à avaliação do valor nutritivo dos alimentos, sugere que também estas devam ser motivo de discussão quando se trata de eleger qual a técnica mais eficiente para os fins pretendidos. Desta forma, devido à actual necessidade de aumento da produção de alimentos para animais conjugada com a preocupação de conservação do ambiente, houve necessidade de se conceberem novas estratégias para a produção animal (Krishnamoorthy, *et al.*, 2005). Segundo estes autores as técnicas que reproduzem ou imitam os processos de degradação de nutrientes do alimento no intestino, manifestam uma redução da dependência relativamente aos animais e criam uma maior flexibilidade na avaliação de alimentos em laboratório, o que pode permitir uma intensificação de estudos nesta área de investigação podendo ser alcançado um valor acrescentado superior na utilização de recursos ambientais e económicos.

A Técnica de Produção de Gás tem atraído a atenção de muitos investigadores por todo o mundo e as áreas de trabalho em que esta técnica directa ou indirectamente tem sido utilizada, são igualmente vastas. Mould *et al.* (2005 a); Lopez *et al.* (2007); Sandoval-Castro *et al.* (2005); Mould *et al.* (2005 b); Mould *et al.* (2005 c); Dijkstra, *et al.* (2005); Parissi, *et al.* (2005); Krishnamoorthy, *et al.* (2005); Gasmi-Boubaker *et al.* (2005), são alguns dos autores com trabalhos e estudos nesta matéria. As questões envolvidas com esta técnica e a sua vasta aplicação têm sido motivo de realização de muitos artigos e conferências internacionais e o conselho editorial da revista “Animal Feed Science and Technology” reconhece o papel crescente da Técnica de Produção de Gás (GPT), na investigação e avaliação do valor nutritivo de alimentos (Krishnamoorthy, *et al.*, 2005). Estes autores mencionam que a IVGPT (Técnica de Produção de Gás *in vitro*) é uma técnica relativamente barata, pode permitir medições em larga escala de emissão de metano, bem como avaliar estratégias para suprimi-las. Referenciam esta técnica como suportando mal a repetibilidade, aludindo às dificuldades que se encontram quando se comparam dados entre laboratórios ou mesmo no próprio laboratório, sendo muitas vezes necessário proceder a correcções matemáticas entre laboratórios (Rymer *et al.* e Van Gelder *et al.*, 2005 citados por Krishnamoorthy, *et al.*, 2005).

A abordagem da IVGPT envolve várias questões que motivam uma alargada discussão pois trata-se de uma técnica que apesar de muito interessante, tem algumas limitações. Dijkstra *et al.* (2005), referem que para uma avaliação mais completa de sistemas alimentares, a técnica “*in situ*” é mais completa e correcta, embora com limitações quando se trata de um número vasto de amostras. Gasmi-Boubaker *et al.* (2005) apresentam contudo resultados que os levaram a concluir que a IVGPT é mais sensível do que uma técnica “*in situ*” para determinar o valor nutritivo dos alimentos quando contêm taninos. Contudo, deve existir um cuidado especial ao interpretar os dados de alimentos com taninos baseados em técnicas *in vivo* ou *in situ* pois podem subestimar-se efeitos *in vivo* de dimensão desconhecida (Norton, 2000, citado por Gasmi-Boubaker, 2005).

As referências anteriores parecem sugerir que a Técnica de Produção de Gás (GPT), pode constituir-se actualmente como o método mais interessante para o estudo de alguns parâmetros do valor nutritivo de alimentos para animais.

## **4.2 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE AMOSTRAGEM MAIS CORRECTO PARA CARACTERIZAR UMA FORRAGEM**

Foi determinada a variância entre amostras individuais, nos parâmetros MS, CT e PB, de um mesmo feno, e a variância entre fenos, segundo ambos os métodos de amostragem.

Foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre amostras individuais de um mesmo feno, para parâmetros MS, CT e PB.

Nos quadros 16 e 17 apresentam-se, a título de exemplo, os valores encontrados para as amostras individuais da Herdade “Catarina Vaz” e da Cooperativa do Escoural.

O Quadro 18 resume os valores encontrados para os mesmos parâmetros, mas agora para os dois sistemas de amostragem. Podemos observar que o parâmetro que apresenta maiores variações, é a PB em ambos os métodos, seguido do parâmetro CT.

Em qualquer deles, o teor mínimo de PB refere-se à Herdade do Xerês (amostra 9), com o feno de aveia\*vicia, mas tal não se verifica para os teores máximos que, segundo o método das amostras individuais, coube à Herdade de Sta. Luzia (amostra 14), num

feno de aveia\*tremocilha. Para o método das amostras compósitas, é a Herdade da Quinta Nova do Ramires (amostra 11), que apresenta o teor mais elevado.

**Quadro 16. Valores encontrados para as amostras individuais da Herdade de “Catarina Vaz”, em feno de aveia\*vicia\*cevada.**

EXPLORAÇÃO	Fardo nº	MS	CT	PB
HERDADE CATARINA VAZ (AVEIA X VÍCIA X CEVADA)	1	90,35	4,59	6,18
	2	90,19	5,38	6,75
	3	89,97	4,21	6,02
	4	91,51	4,50	6,48
	5	91,10	6,55	6,11
	6	90,27	5,77	4,58
	7	92,24	7,41	4,62
	8	91,28	4,10	4,51
	9	90,73	5,04	4,90
	10	89,05	4,30	6,33

MS - matéria seca, expressa em %.

CT – cinza total, expressa em %, na matéria seca.

PB – proteína bruta, expressa em %, na matéria seca.

**Quadro 17. Valores encontrados para as amostras individuais da Cooperativa do Escoural, em feno de espontâneas.**

EXPLORAÇÃO	Fardo nº	MS	CT	PB
COOPERATIVA DO ESCOURAL (ESPONTÂNEAS)	1	92,13	18,51	11,36
	2	89,60	6,22	6,73
	3	91,66	6,09	6,85
	4	89,76	5,45	6,82
	5	91,44	6,21	11,00
	6	91,17	5,62	6,54
	7	90,94	6,77	7,84
	8	91,42	7,67	7,72
	9	91,79	6,80	8,01
	10	91,40	5,91	10,75

MS - matéria seca, expressa em %.

CT – cinza total, expressa em %, na matéria seca.

PB – proteína bruta, expressa em %, na matéria seca.

**Quadro 18. Teores de MS, CT e PB, que resultam da média das 10 amostras individuais dos fenos amostrados, e teores encontrados nas respectivas amostras compósitas.**

NÚMERO DO FENO AMOSTRADO	AMOSTRAS INDIVIDUAIS (1)			AMOSTRAS COMPÓSITAS (2)		
	MS %	CT %	PB %	MS %	CT %	PB %
6	90,67	5,18	5,64	91,28	5,42	7,16
7	92,59	7,53	8,75	90,35	8,74	6,28
8	90,87	5,82	6,52	90,55	5,59	7,06
9	91,78	6,13	4,74	91,17	6,57	4,92
10	92,04	5,37	5,69	91,51	5,67	5,67
11	92,37	6,54	7,20	92,78	6,40	8,31
12	92,72	7,54	6,22	93,15	6,81	6,98
13	91,80	5,88	7,37	91,72	5,39	7,72
14	92,35	5,78	8,92	92,04	5,53	6,59
15	91,13	7,52	8,36	91,24	6,08	8,25
18	91,67	5,32	8,83	91,64	5,40	6,06
19	91,67	5,61	6,02	92,09	5,76	7,51

(1) – Representada pela media das 10 amostras individuais.

(2) – Representado pelo valor obtido para uma amostra compósita de 16 fardos.

NOTA: Como base para determinar qual o método de amostragem mais correcto, estão valores de apenas 12 amostragens, por ser esse o numero de casos em que se possuem, simultaneamente, amostras compósitas e amostras individuais.

**Quadro 19. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação, resultantes da análise de 12 fenos amostrados, segundo 2 métodos diferentes de amostragem.**

Amostras		$\bar{x}$	$\sigma$	CV %
MÉTODO DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS	MS	91,83	± 0,66	0,72
	CT	6,18	± 0,88	14,28
	PB	7,02	± 1,43	20,37
MÉTODO DAS AMOSTRAS COMPÓSITAS	MS	91,63	± 0,82	0,89
	CT	6,11	± 9,96	15,67
	PB	6,87	± 1,03	14,99

$\bar{x}$  – Média

$\sigma$  - Desvio padrão

CV – coeficiente de variação

Para testar se existiam diferenças entre os 2 métodos de amostragem, fomos calcular a variância entre fenos amostrados obtida a partir das amostras individuais, e a variância obtida a partir das amostras compósitas.

As variâncias encontradas foram submetidas a um teste de Fisher, que revelou não serem significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ), em todos os parâmetros analisados.

### 4.3 NÚMERO MÍNIMO DE FARDOS A AMOSTRAR POR EXPLORAÇÃO

Como se concluiu anteriormente não serem significativas as diferenças entre os dois métodos de amostragem, optou-se por assumir que o método mais eficaz, para o estudo em causa, será o que tem por base as amostras compósitas. No campo, esse método torna-se mais prático e mais simples, e, em laboratório, o processamento e a obtenção dos resultados são mais rápidos, devido à diminuição do número de análises a efectuar, por exploração.

Assim impunha-se que se determinasse, dentro desse método, qual o número mínimo de fardos a amostrar, para que a amostra recolhida fosse representativa da população em causa, ou seja, que conduzisse a uma melhoria da repetibilidade.

Por ser a PB o parâmetro que revelou maior variação, foi esse o utilizado para este estudo.

Determinámos a repetibilidade entre fardos, utilizando a fórmula:  $R = \sigma^2 E / (\sigma^2 F + \sigma^2 E)$  ou seja: a variância dos fenos sobre a variância dos fardos, mais a variância dos fenos; encontrando-se o valor 0,2376, para as nossas condições experimentais.

Seguidamente calculamos a variação da repetibilidade de acordo com o número de fardos a amostrar (Quadro 20).

**Quadro 20. Variação da repetibilidade, de acordo com o número de fardos a amostrar.**

NÚMERO DE FARDOS A AMOSTRAR PARA ALÉM DOS 10	b	ERRO PADRÃO ESTIMADO DA MÉDIA DOS FENOS	$\Delta b$	VARIAÇÃO DO ERRO PADRÃO
n	(1)	S.E. (2)		$\Delta$ S.E.
0	0,27	0,658	0,16	0,057
2	0,43	0,601	0,17	0,045
4	0,60	0,556	0,09	0,035
6	0,69	0,521	0,06	0,030
8	0,75	0,491	0,04	0,025
10	0,79	0,466	0,03	0,022
12	0,82	0,444	0,02	0,019
14	0,84	0,425	0,02	0,017
16	0,86	0,408	0,01	0,015
18	0,87	0,393		

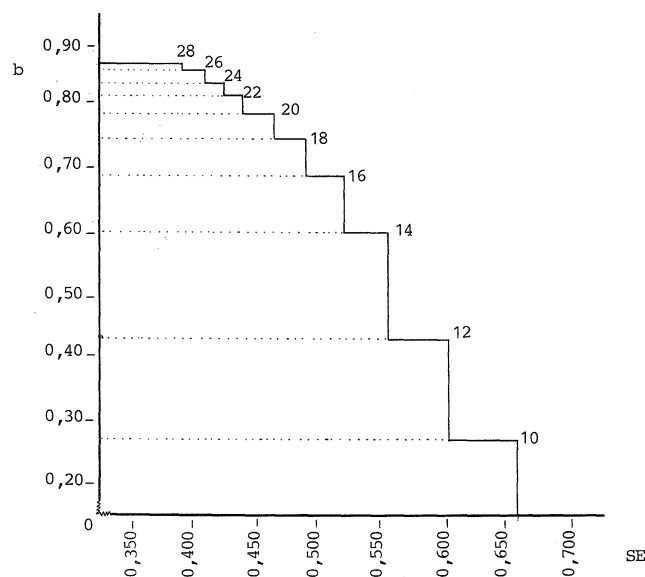
(1)  $b = nR / (1 + (n-1)R)$ ;  $R=0,27$  (para 10 fardos)

(2)  $S.E. = \sqrt{(\delta^2 + 2 \sigma^2 F) / (2 \times n)}$

$n$  = nº de fardos a amostrar;  $R$  = repetibilidade

$\delta^2$  = variância do erro;  $\sigma^2 F$  = variância dos fardos





**Figura 26. Representação gráfica da variação da repetibilidade, de acordo com o número de fardos a amostrar.**

Analisando o Quadro 20 e a Figura 26, observa-se que o valor da repetibilidade vai crescendo, à medida que aumentamos o número de fardos amostrados, e que o erro padrão estimado da média dos fenos vai diminuindo. No início, a variação ( $\Delta b$  e  $\Delta S.E.$ ), devida ao aumento do número de fardos amostrados, é significativa, como se pode observar; no entanto, a partir de  $n=10 + 6$ , essa variação é mais reduzida e, aí deixa de ser compensatório o acréscimo do número de fardos amostrados.

Almeida *et al.* (1987), no seu trabalho refere que para garantir a representatividade das amostras compósitas foi necessário recolher em cada exploração 16 subamostras de 16 fardos escolhidos ao acaso, as quais eram então reunidas numa única amostra compósita para cada tipo de feno e para cada exploração.

Contudo, Undersander *et al.* (2005), concluem ser importante a recolha de amostra em 20 fardos se forem rectangulares pequenos ou 8 a 10 no caso de fardos de grandes dimensões. Estes autores atribuem a necessidade de efectuar um número superior de recolha de amostras face ao recomendado por Rosalino (1986) e Almeida *et al.* (1987), como forma de garantir homogeneidade na amostra de feno recolhido em fardos de um mesmo lote.

## **5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE ACÇÕES A DESENVOLVER**

### **5.1 CONCLUSÕES**

O trabalho agora apresentado tem por base o estudo anterior (1986), sendo agora os seus resultados objecto de uma nova discussão à luz de conhecimentos mais recentes, permitindo obter novas conclusões sobre as matérias em estudo. Foram incluídas nesta dissertação como novas temáticas, uma breve análise conjuntural da região (Alentejo) com uma caracterização do sub-sector das forragens e uma abordagem às actuais técnicas de fenação e importância da caracterização do valor nutritivo das forragens conservadas.

O trabalho conduziu às seguintes novas conclusões:

- Decorrido um espaço temporal de 25 anos volvidos entre o anterior trabalho e o agora apresentado, pode constatar-se que a intensidade da investigação nestas matérias não foi muito significativa. Surgem contudo, estudos relativos a estas temáticas, sobretudo por parte de investigadores de países do continente africano mais junto à orla mediterrânica. Ao nível europeu as tendências da investigação centraram-se em grande parte nas questões ligadas ao aperfeiçoamento dos métodos laboratoriais.
- Não foi possível comparar com estudos mais recentes os resultados quanto à determinação dos dois métodos de amostragem praticados para caracterizar o valor nutritivo médio do feno numa exploração. Desta forma continua a concluir-se que o método das amostras compósitas não se revelou significativamente diferente ( $P > 0,05$ ) do método das amostras individuais, e é de mais fácil execução.
- A repetibilidade do parâmetro analisado, que apresentou maior variação no estudo anterior melhorou à medida que se aumentou o número de fardos a amostrar por exploração. No entanto, a partir de 16 fardos os acréscimos tornam-se muito menores, pelo que se considerou ser esse o número ideal de fardos a amostrar.

- Relativamente aos métodos laboratoriais de avaliação de qualidade do valor nutritivo em forragens, a Técnica de Produção de Gás *in vitro* (IVGPT) é a abordagem mais discutida recentemente.
- Os fenos amostrados, no Alentejo, classificaram-se como de má qualidade, apresentando teores de proteína bruta e valores de digestibilidade da matéria orgânica na matéria seca muito baixos. A contribuição da leguminosa, para a composição dos fenos de consociação, parece ter sido muito pequena. Os resultados encontrados anteriormente foram semelhantes aos obtidos por outros autores nacionais e estrangeiros para as forragens estudadas, e semelhantes aos obtidos mais recentemente para o mesmo tipo de forragens.
- No anterior trabalho foi grande a variação encontrada entre os diferentes fenos analisados. Os principais factores parecem ser os cortes tardios, com a forragem muito madura e de baixa qualidade e as grandes perdas por desfolhamento. As razões ou causas apontadas para os resultados obtidos foram agora novamente discutidos e continuam a ser corroborados por outros autores com trabalhos mais recentes.
- Não se verificou uma evolução muito significativa nas áreas ocupadas por forragens na Superfície Agrícola Útil do Alentejo ao longo da série 1989 a 2005. Verificou-se que ocorreu entre o ano de 1995 e 1997 uma quebra e uma tendência positiva no período entre 1997 e 1999. Para o período seguinte as áreas ocupadas mantêm-se mais elevadas que nos primeiros anos da serie mas sem oscilações muito significativas. Relativamente ao País, o Alentejo mantém uma tendência muito semelhante embora com um desfasamento temporal. A evolução da área de culturas forrageiras acompanhou a evolução da área de culturas temporárias. O seu ponto máximo verificou-se em 1989, variando as áreas de forma irregular ao longo da série, deixando antever uma tendência para um acréscimo das áreas nos últimos anos analisados. Espera-se que estas áreas possam vir a ser actualmente incrementadas devido às novas áreas de regadio disponíveis, através do Empreendimento de Fins Múltiplos do Alqueva (EFMA) uma vez que a tendência actualmente é para o uso de forragens de regadio.
- Actualmente as forragens que estão a ser produzidas pelos agricultores são diferentes das estudadas anteriormente. Surgiu essencialmente o feno de azevem

e de luzerna, forragens que até esta data eram muito pouco cultivadas no Alentejo. No que diz respeito ao valor nutritivo de fenos, a inovação face ao estudo anterior centra-se no tipo de forragens estudadas. A luzerna *Medicago sativa* é neste momento uma das forragens com mais incidência de estudo quer em Portugal quer noutros países.

- Quanto às tecnologias de fenação, observou-se que a inovação surgiu essencialmente na tipologia de máquinas utilizadas, que conduziram a grandes reduções de tempo, custos e esforço físico, e no acondicionamento, através do alargamento da dimensão e densidade dos fardos e o tipo de material que sujeita a forragem. As tecnologias de fenação modificaram-se havendo a tendência para a produção de fardos redondos e de grande dimensão, sujeitos através de malha ou ainda em algumas situações de uma tela contínua de plástico.

## 5.2 PROPOSTAS DE ACÇÕES A DESENVOLVER

- Até aqui, os fardos rectangulares de pequena dimensão têm sido mais estudados do que os de grande dimensão, contudo é importante que se intensifique o estudo da amostragem nos fardos grandes pois começa a ser a dimensão mais frequente no Alentejo.
- Continua a verificar-se a necessidade de se incentivar um serviço analítico de forragens e alimentos para animais, ao qual os agricultores possam recorrer, de forma a poderem fazer um planeamento alimentar mais eficaz dos efectivos pecuários, que permita otimizar as performances, reduzir os custos de produção e consequentemente o acréscimo dos lucros das empresas agropecuárias.
- Continua a considerar-se que seria importante a implementação de uma escala de classificação de fenos, tomando como referência a sua qualidade em função de parâmetros como a *Digestibilidade* e a *Proteína Bruta*. A comercialização destes, em função dessa classificação, teria certamente uma repercussão no melhoramento do valor nutritivo dos fenos do Alentejo.
- A procura efectuada revelou que existe ao nível do Ministério da Agricultura Português uma preocupação no sentido de contemplar este subsector com apoios (*Sistema de Apoio à Produção de Forragens Secas*), traduzindo assim a

importância de que o mesmo se reveste para as políticas agrícolas. No entanto, pela prospecção realizada, ficou claro que a produção que é submetida a apoio é muito inferior à que realmente poderia beneficiar desta linha de ajudas financeiras. Ao ler o regulamento da medida, observamos que é bastante complexo, e de difícil interpretação. A sua divulgação junto dos eventuais interessados poderá não ter sido eficaz, tornando-se necessária a realização de uma avaliação para conhecer os motivos que levam a tão baixa adesão e propor medidas que fomentem a motivação dos agricultores a estes apoios, conduzindo ao incremento das áreas cultivadas e ao aumento das produções de forragens para feno no Alentejo

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, J.M., Calouro, M.F. & Soares, A.M.B. (1982). Tabelas de valor alimentar. *In: Forragens mediterrânicas cultivadas em Portugal - 1ª contribuição. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Instituto Nacional de Investigação Agrária.*

Alexander, R.H. & McGowan, M. (1961). A filtration procedure for the *in vitro* determination of digestibility of herbage. *J. Brit. Grassld Soc.*, 16, 275-276.

Amante, H., Barradas, A. & Carneiro, J.P. (2005) Avaliação de variedades de luzerna (*Medicago sativa* L.) em condições de regadio do Alqueva. Disponível em: Centro Operativo e de Tecnologia do Regadio (COTR), <http://www.cotr.pt/assoc.asp>

Almeida, J.A.A. (1982a). Valor Nutritivo do Feno e Planeamento Alimentar. *Évora, Universidade de Évora, (Boletim de Extensão Rural 2).*

Almeida, J.A.A. (1982b). Importância das Forragens Conservadas na Produção Animal. *Universidade de Évora, Secção de Extensão Rural (não publicado).*

Almeida, J.A.A., Bento, O.P., Lança, A. & Abreu, M.C. (1987). Valor nutritivo dos fenos produzidos no Alentejo (resultados do 2º ano de observações). VIII Reunião de Primavera da SPPF, Évora, Abril. *In: Sep., Pastagens e Forragens*, 8 (1), 169-178.

Amella, A., Maestro, M., Ferrer, C. & Broca, A. (1982). Exploracion de pastos en Caserios Guipuzcoanos. III. Forragens Conservadas y otros Alimentos. Instituto de Economia Y Producciones Ganaderas del Ebro (CSIC) nº 56, Facultad de Veterinária. Zaragoza.

Balch, C.C. & Campling, R.C. (1962) Regulation of voluntary food intake in ruminants. *Nutrition Abstracts and Reviews*, vol. 32, nº 3.

Barber, W., Adamson, A. & Altman, J. (1984). New methods of forage evolution. *In Recent Advances in Animal Nutrition*, Ed. Haresign, W & Cole, D., Publ. Butterworths.

Bento, O.P., Pereira, A.M., Almeida, J.A. & Carvalho, M.J.C. (1987a). Influência da época de corte e da forma de conservação sobre o valor alimentar da aveia+vicia. VIII Reunião de Primavera da SPPF, Évora, Abril. *In: Sep., Pastagens e Forragens*, 8(1), 99-109.

Bento, O.P., Almeida, J.A., Rosalino, J.F.S. & Abreu, M.C. (1987b). Método de amostragem de fenos para avaliação do valor nutritivo. VIII Reunião de Primavera da SPPF, Évora, Abril. *In: Sep., Pastagens e Forragens*, 8(1), 161-168.

Caballero, R., Goicoechea, E.L. e Hernaiz, P.J. (1995) Forage yields of common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of vetch. *Field Crops Research* 41, 135-140.

Caballero, R., Rebolé, A., Barro, C., Alzueta, C., Treviño, J. & Garcia, J. (1996). Farming practices and chemical bases for a proposed quality standard of vetch-cereal hays. *Field Crops Research*, 47, 181-189.

Carvalho, P.V. (1984). Apontamentos da disciplina de Pastagens e Forragens I. *Universidade de Évora*.

Close, W. & Menke, K.H. (1986). The gas production method. *In: Selected Topics in Animal nutrition. Manual prepared for the 3<sup>rd</sup> Hohenheim Course on Animal Nutrition in the Tropics and Semi-Tropics, 2<sup>nd</sup> Edition*, (in cooperation with Steingass, H. & Tröscher, K.H.), DSE & Universität Hohenheim, Federal Republik of Germany, pp. 43-45.

Crespo, D.G. (1975). Factores elementares do Sequeiro do Sul. Pastagens semeadas temporárias e permanentes de sequeiro. *Instituto Nacional de Investigação Agrária (Oeiras), Ministério da Agricultura e Pescas*.

Demarquilly, C. (1981). Stratégie d'utilisation de l'analyse des fourrages. *In Prevision de la Valeur Nutritive des Aliments des Ruminants, publications I.N.R.A., pp. 213-216*.

Demarquilly, C. & Chenost, M. (1969). Etude de la digestion des fourrages dans le rumen par la methode des sachets de nylon, liaisons avec la valeur alimentaire. *Annales de Zootechnie, Versailles*, 15:419-36.

Demarquilly, C. & Jarrige, R. (1981). Panorama des méthodes de prevision de la digestibilité et de la valeur énergétique des fourrages. *In Prevision de la Valeur Nutritive des Aliments de Ruminants, publications I.N.R.A., pp. 41-59*.

Dentinho, M.T.V.C.P., Conde Moreira, O.M.S, Coelho, M.M. & Ramalho Ribeiro, J.M.C. (1993/1994). Valor alimentar do Triticale forrageiro. *Pastagens e Forragens*, 14/15, 189-198.

Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J. & Lopez, S. (2005). Application of the gaz production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science Technology* 123-124, 561-578.

Ferreira, A.M., Silva, A.D., M.A., Vieira, R.F., Azevedo, J. & Sousa, A. (1981). Os fenos do Nordeste de Portugal. 1. Valor enegético e azotado (Resultados do primeiro ano de observações). *II Reunião de Primavera da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens*.

France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., L'opez, S., Bannink, A., (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83, 143–150.

Gasmi-Boubaker, A., C. Kayouli & A. Buldgen, (2005). *In vitro* gas production and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterranean browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124: 303-311.

Hicks, C.R. (1982). Fundamental Concepts in the design of experiments. In *Eds. Holt, Rinehart e Winston, 3th ed., New York, CBS College Publishing*.

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) (1978) – Alimentation des ruminantes. *Versailles, INRA*.

Instituto Nacional de Estatística (1990) Recenseamento Geral Agrícola 1989. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (1994) Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas 1993. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (1996) Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas 1995. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (1998) Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas 1997. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (2000) Recenseamento Geral Agrícola 1999. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Instituto Nacional de Estatística (2004) Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas, 2003. Ed. INE, I.P., Lisboa.



Instituto Nacional de Estatística (2006) Inquérito à Estrutura das Explorações Agrícolas 2005. Ed. INE, I.P., Lisboa.

Krishnamoorthy, U., Rymer, C. & Robinson, P.H. (2005). The *in vitro* gas production technique: limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*, 123/124, 1-7.

Lithourgidis, A.S., Vasilakoglou, I.B., Dhima, K.V., Dordas, C.A. & Yakoulaki, M.D. (2006) Forage yield and quality of common vetch mixtures with oat and triticale in two seedling ratios. *Field Crops Research*, 90, 106-113.

Lopez, S. (2005). In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, Eds. Dijkstra, J., Forbes, J.M. & France, J., second edition, CAB International, Wallingford, UK, pp. 87-122.

Lopez, S., Danhoa, M.S., Dijkstra, J., Banink, A., Kebreab, E. & France, J. (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 135, 139-156.

Marten, G.C. & Barnes, R.F. (1979). Prediction of energy digestibility of forages *in vitro*. Rumen fermentation and fungal enzyme systems; in Standardization of Analytical Methodology of Feeds. *Proceedings of a Workshop*; Eds. Pigden, W.J., Balch, C.C. & Graham, M.; Ottawa, Canada

Martin, T. (1985). Statistics – A Biometrical Approach. *Curso ministrado na Universidade de Évora*.

McDonald, P., Edwards, R.A. & Greenhalgh, J.F.D. (1975). *Nutricion Animal*. 2ª Ed. (Espanhola), Editora Acribia, Zaragoza.

Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Ajuda à produção de forragens secas 2009, disponível em: <http://www.min-agricultura.pt>

Minson, D.J. (1982a). Effect of Chemical Composition on Feed. Digestibility and Metabolizable Energy. *Nutrition Abstracts and Reviews – Serie B*, 52 (10).

Minson, D.J. (1982b) Relationships of Conventional and Preferred Fractions to Determined Energy Values. In *Standardization of Analytical Methodology of Feeds, Proceedings of a Workshop*; Eds. Pigden, W.J., Balch, C.C. & Graham, M.; Ottawa, Canada

Moreira, N. (1982). Produção de forragens e pastagens no sequeiro mediterrânico. II. Data de corte de uma consociação de aveia\*ervilhaca. *III Reunião da Primavera da Sociedade Portuguesa de Pastagens e forragens*.

Mould F.L., Kliem K.E., Morgan R., Mauricio R.M. (2005a). In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim Feed Sci Technol* 123-124: 31-50.

Mould F.L., Morgan R., Kliem K.E., Krysstallidou E. (2005b). A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim Feed Sci Technol* 123-124: 155-172.

Mould F.L., Kliem K.E., Morgan R., (2005c). Alternative methodologies – stretching their in vitro box. *Anim Feed Sci Technol* 123-124: 501-515.

Mpairwe, D.R., Sabiiti, E.N., Ummuna, N.N., Tegegne, A. E Osuji, P. (2003a). Integration of forage legumes with cereal crops. I. Integration of forage legumes with graded levels of lablab hay on voluntary food intake, digestibility, milk yield and milk composition of crossbred cows fed maize-lablab stover or oats-vetch hay ad libitum. *Livestock Production Science* 79, 193-212.

Mpairwe, D.R., Sabiiti, E.N., Ummuna, N.N., Tegegne, A. E Osuji, P. (2003b). Integration of forage legumes with cereal crops. II. Effect of supplementation with lablab hay and incremental levels of wheat bran on voluntary food intake, digestibility, milk yield and milk composition of crossbred cows fed maize-lablab stover or oats-vetch hay ad libitum. *Livestock Production Science* 79, 213-226.

Oklahoma Cooperative Extension Service, Alfalfa sampling equipment. Oklahoma Alfalfa, Allen, E., Oklahoma State University, Department of Plant and Soil Sciences, disponível em: <http://alfalfa.okstate.edu/webnews/quality6.htm>.

Parissi, Z.M., Papachristou, T.G. & Nastis, A.S. (2005). Effect of drying method on estimated nutritive value of browse species using an *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 123/124, 119-128.

Pinheiro, A.C. e Peça, J.O. (2004) Forage drying models for oats and vetches under Mediterranean climate conditions. *Mathematics and Computers in Simulation* 65, 87-100.

Raymond, F., Shepperson, G. & Waltham, R. (1977). *Forrage*. Ediciones GEA, Barcelona.

Rhykerd, C.L., Almeida, J.A.A. e Serrano, J. E. (1982). *Boletim de Extensão Rural* nº 2, Universidade de Évora

Rosalino, J.F.S. (1986). Caracterização do valor nutritivo dos fenos produzidos no Alentejo. Trabalho de fim de Curso. Évora, Universidade de Évora, Departamento de Zootecnia, 63 Pp.

Sampling hay and standing forage. Publication # NF-FO-97-02. Disponível em: <http://agronomy.ucdavis.edu/alfalfa.wg/SUBPAGES/ForageQuality/ListofHayProbes.htm>

Sandoval-Castro, C.A., Lizarraga-Sanchez, H.L. & Solorio-Sanchez, F.J. (2005). Assessment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, in vitro gas production and in situ degradability. *Animal Feed Science and Technology* 123–124, 277–289.

Saxena, J.S., Upadhyaya, R.B. & Sharma, K.M. (1973). Studies on the Nutritive Value of Composite Fodder Oats and Vetches. *Indian Veterinary Journal* 50 (6) 584-587.

Serrano, J.E. (1978). Variação diurna dos glúcidos citoplasmáticos totais na aveia x vicia e ao longo do seu desenvolvimento. Sua influencia no valor nutritivo dos fenos. *Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Zootécnica Nacional*.

Serrano, J.E. (1979). A determinação em rotina da digestibilidade *in vitro* nos alimentos fibrosos pelo método de Tilley e Terry, modificado por Alexander. *Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Zootécnica Nacional*.

Serrano, J.E. (1981). A fenação. Normas fundamentais no fabrico do feno. *Ministério da Agricultura e Pescas, Direcção-Geral de Extensão Rural (Divulgação nº 8)*.

Serrano, J.E. (2002) Tecnologia da fenação. *Publicações “Universidade de Évora”, Série Ciências Agrárias*, nº 8, 84 Pp. ISBN 972-778-045-8.

Tilley J M A & Terry R A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc.* 18:104-11.

Undersander, D., Shaver, R., Linn, J., Hoffman, P. & Peterson, P. (2005). Sampling hay, silage and total mixed rations for analysis. A2309, Ed. *Cooperative Extension Publishing, University of Wisconsin-Extension, Madison, USA*.

Vas Es, A.J.H. (1982). Methods for the Analysis of de Energy Content of Ruminant Feeds; in Recent Advances in Animal Nutrition; *Edit. Haresign, W., Publ. Butterworths.*

Van Soest, P J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* 46:829-35.

Van Soest, P.J. (1982). Nutricional Ecology of the Ruminant. *Edit. O e B Books, Inc., Oregon, USA.*

## **ANEXO I – DIRECTIVAS DA COMISSÃO EUROPEIA**

Directiva da Comissão (76/371/EEC)

PRIMEIRA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 1 de Março de 1976 que fixa as formas de recolha comunitárias de amostras para o controlo oficial dos alimentos para animais

Directiva da Comissão (71/393/CEE)

SEGUNDA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 18 de Novembro de 1971 que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais (71/393/CEE)

Directiva da Comissão (72/199/CEE)

TERCEIRA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 27 de Abril de 1972 que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo dos alimentos para animais

**PRIMEIRA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 1 de Março de 1976 que fixa as formas de recolha comunitárias de amostras para o controlo oficial dos alimentos para animais**

(76/371/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva do Conselho, de 20 de Julho de 1970, que diz respeito à introdução de formas de recolha de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais (1), com última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão (2) e, nomeadamente, o seu artigo 2o,

Considerando que a directiva acima referida prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais, para verificar se as condições prescritas em virtude das disposições legislativas regulamentares e administrativa respeitantes à qualidade e composição dos alimentos para animais são respeitadas, são efectuadas segundo as formas de recolha de amostras e os métodos de análise comunitários,

Considerando que convém fixar, numa primeira etapa, as formas de recolha de amostras para o controlo dos compostos dos alimentos para animais, e dos seus aditivos, assim como para o controlo das substâncias e produtos indesejáveis, à excepção dos resíduos de pesticidas e dos microrganismos que estes alimentos podem conter;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

**Artigo 1o**

Os Estados-membros determinam que as recolhas de amostras para os controlos oficiais dos alimentos para animais, no que diz respeito à determinação dos compostos, dos aditivos e das substâncias e produtos indesejáveis à excepção dos resíduos de pesticidas e dos microorganismos, são efectuadas segundo as formas descritas no anexo da presente directiva.

**Artigo 2o**

Os Estados-membros põem em vigor a 1 de Janeiro de 1977, o mais tardar, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva e do facto informam imediatamente a Comissão.

**Artigo 3o**

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 1 de Março de 1976.

Pela Comissão

P. J. LARDINOIS

Membro da Comissão

(1) JO no L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.(2) JO no L 73 de 27. 3. 1972, p. 14.

**ANEXO**

**FORMAS DE RECOLHA AMOSTRAS**

**1. OBJECTO E DOMÍNIO DE APLICAÇÃO**

As amostras destinadas aos controlos oficiais de alimentos para animais no que diz respeito à sua qualidade e composição são recolhidas de acordo com as regras seguidamente indicadas. As amostras assim obtidas são consideradas como sendo representativas dos lotes.

**2. AGENTES HABILITADOS PARA A AMOSTRAGEM**

As colheitas são efectuadas por agentes mandatados para o efeito pelos Estados-membros.

**3. DEFINIÇÕES**

Lote: Quantidade de produtos constituindo uma unidade e tendo as características pressupostas uniformes.

Recolha elementar: Quantidade recolhida num ponto do lote.

Amostra global: Conjunto de colheitas elementares efectuadas no mesmo lote.

Amostra reduzida: Parte representativa da amostra global, obtida por redução desta.

Amostra final: Parte de amostra reduzida ou da amostra global homogeneizada.

#### 4. APARELHAGEM

4.1. Os aparelhos destinados às colheitas devem ser construídos em materiais que não contaminem os produtos a recolher. Estes aparelhos podem ser aprovados pelos Estados-membros.

4.2. Aparelhos recomendados para amostragem dos alimentos sólidos

4.2.1. Amostragem manual

4.2.1.1. Pá de fundo chato e de bordos verticais.

4.2.1.2. Borda com brecha longa ou compartimentada. As dimensões da sonda devem ser adaptadas às características do lote (profundidade do recipiente, dimensões do saco, etc.) e ao tamanho das partículas que compõem o alimento.

4.2.2. Amostragem mecânica

Os aparelhos mecânicos aprovados podem ser utilizados para recolher as amostras dos alimentos em movimento.

4.2.3. Divisor

Aparelhos destinados a dividir a amostra em partes aproximadamente iguais, podem ser utilizados para as colheitas elementares, assim como para a preparação das amostras reduzidas e amostras finais.

#### 5. EXIGÊNCIAS QUANTITATIVAS

5.A. Respeitantes aos controlos das substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos

5.A.1. Lote

A dimensão do lote deve ser de forma a que todas as partes que o compõem possam ser amostradas.

"" ID="1">5.A.2. Recolhas elementares"> ID="1">5.A.2.1. Alimentos a granel> ID="2">Número mínimo de colheitas elementares"> ID="1">5.A.2.1.1. Lotes não excedendo 2,5 toneladas> ID="2">7"> ID="1">5.A.2.1.2. Lotes de mais de 2,5 toneladas> ID="2">& radic; 20 vezes o número de toneladas que constituem a lote (1)(),

limitado a um número máximo de 40 colheitas elementares,"> ID="1">5.A.2.2. Alimentos embalados> ID="2">Número mínimo de embalagens de amostras a coleccionar (2)()> ID="1">5.A.2.2.1. Embalagens com um conteúdo superior a um quilograma"> ID="1">5.A.2.2.1.1. Lotes compostos de 1 a 4 quilograma embalagens> ID="2">Todos as embalagens"> ID="1">5.A.2.2.1.2. Lotes compostos de 5 a 16 embalagens> ID="2">4"> ID="1">5.A.2.2.1.3. Lotes compostos de mais de 16 embalagens> ID="2">& radic; do número de embalagens que compõem o lote (1)(),

limitado a um máximo de 20 embalagens"> ID="1">5.A.2.2.2. Embalagens com um conteúdo não excedendo um quilograma> ID="2">4"> ID="1">5.A.2.3. Alimentos líquidos ou semilíquidos> ID="2">Número mínimo de recipientes para coleccionar amostras (2)()> ID="1">5.A.2.3.1. Recipientes de conteúdo superior a um litro"> ID="1">5.A.2.3.1.1. Lotes compostos de 1 a 4 recipientes> ID="2">Todos os recipientes"> ID="1">5.A.2.3.1.2. Lotes compostos de 5 a 16 recipientes> ID="2">4"> ID="1">5.A.2.3.1.3. Lotes compostos de mais de 16 recipientes> ID="2">& radic; do número de recipientes que compõem 7o lote (1)(),

limitado a um máximo de 20 recipientes"> ID="1">5.A.2.3.2. Recipientes de conteúdo não excedendo um litro> ID="2">4"> ID="1">5.A.2.4. Blocos minerais para lamber> ID="2">Número mínimo de blocos minerais para coleccionar amostras (2)(): Uma barra ou pedra por lote de 25 unidades, limitada a um máximo de 4 barras ou pedras"> ID="1">5.A.3. Amostra global">Uma só amostra global por lote é pedida. A totalidade de massa ou do volume das colheitas elementares destinadas a constituir a amostra global, não pode ser inferior às quantidades seguintes:" ID="1">5.A.3.1. Alimentos a granel> ID="2">4 Quilogramas"> ID="1">5.A.3.2. Alimentos embalados"> ID="1">5.A.3.2.1. Embalagens com um conteúdo superior a um quilo> ID="2">4 Quilogramas"> ID="1">5.A.3.2.2. Embalagens de conteúdo não excedendo um quilograma> ID="2">peso do conteúdo de 4 embalagens de origem"> ID="1">5.A.3.3. Alimentos líquidos ou semilíquidos"> ID="1">5.A.3.3.1. Recipientes de conteúdo superior a um litro> ID="2">4 litros"> ID="1">5.A.3.3.2. Recipientes de conteúdo não excedendo um litro> ID="2">volume do conteúdo de 4 recipientes de origem"> ID="1">5.A.3.4. Blocos minerais para lamber"> ID="1">5.A.3.4.1. Cujo peso unitário é superior a um quilo> ID="2">4 quilos"> ID="1">5.A.3.4.2. Cujo peso unitário não exceda um quilo> ID="2">peso de 4 blocos minerais de origem"> ID="1">5.A.4. Amostras finais">A amostra global dará lugar, depois da redução se necessário, a amostras finais. A análise de, pelo menos uma amostra final, é requerida. A massa ou o volume da amostra final destinada à análise não pode ser inferior às quantidades seguintes:" ID="1">Alimentos sólidos> ID="2">500 gramas"> ID="1">Alimentos líquidos ou semilíquidos> ID="2">500 mililitros">5.B. Respeitantes aos controlos de substâncias ou produtos indesejáveis susceptíveis de ser repartidos não uniformemente nos alimentos, tais como as aflatoxinas, cravagem de centeio, de rícino, a crotalaria nos alimentos simples (4)() ID="1">5.B.1. Lote: Ver 5.A.1."> ID="1">5.B.2. Recolhas elementares"> ID="1">5.B.2.1. Alimentos a granel: Ver 5.A.2.1."> ID="1">5.B.2.2. Alimentos embalados> ID="2">Número mínimo de embalagens a amostrar"> ID="1">5.B.2.2.1. Lotes compostos de 1 a 4 embalagens> ID="2">todas as embalagens"> ID="1">5.B.2.2.2. Lotes compostos de 5 a 16 embalagens> ID="2">4"> ID="1">5.B.2.2.3. Lotes compostos de mais de 16 embalagens> ID="2">&radic; do número de embalagens que compõem o lote (3)(), limitado a um máximo de 40 embalagens.">

#### 5.B.3. Amostras globais

O número de amostras globais variará em função do tamanho do lote. O número mínimo de amostras globais por lote é dado a seguir. A massa das colheitas elementares destinadas a constituir cada amostra global não pode ser inferior a 4 quilos.

##### 5.B.3.1.

"" ID="1">Até 1> ID="2">1"> ID="1">mais que 1 e até 10> ID="2">2"> ID="1">mais de 10 e até 40> ID="2">3"> ID="1">mais de 40> ID="2">4">

##### 5.B.3.2.

"" ID="1">de 1 a 16> ID="2">1"> ID="1">de 17 a 200> ID="2">2"> ID="1">de 201 a 800> ID="2">3"> ID="1">mais de 800> ID="2">4">

#### 5.B.4. Amostras finais

Cada amostra global dará lugar, após redução, à obtenção de amostras finais. É requerida a análise de, pelo menos uma amostra final por amostra global. A massa da amostra final destinada à análise não pode ser inferior a 500 gramas.

## 6. INSTRUÇÕES RESPEITANTES ÀS COLHEITAS, À PREPARAÇÃO E AO CONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

### 6.1. Generalidades

Recolher e preparar as amostras tão rapidamente quanto possível tendo em conta as precauções requeridas para evitar que o produto seja alterado ou contaminado. Os instrumentos assim como as superfícies e os recipientes destinados a receber as amostras devem ser limpos e secos.

### 6.2. Recolhas elementares

#### 6.2.A. Destinadas aos controlos das substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos

As colheitas elementares devem ser efectuadas ao acaso no conjunto do lote. As suas massas ou volumes devem ser aproximadamente iguais.

##### 6.2.A.1. Alimentos a granel



Dividir simbolicamente o lote em partes aproximadamente iguais. Escolher ao acaso um número de partes que correspondam ao número de colheitas elementares previstas em 5.A.2. e retirar pelo menos uma amostra em cada uma dessas partes.

Eventualmente, guardar as amostras aquando da movimentação do lote (carregamento e descarga).

6.2.A.2. O número requerido de embalagens para guardar as amostras é delimitado como é indicado em 5.A.2., recolher uma parte do conteúdo de cada embalagem com o auxílio de uma sonda ou de uma pá. Eventualmente recolher as amostras após ter esvaziado separadamente as embalagens.

6.2.A.3. Alimentos líquidos ou semilíquidos homogéneos ou homogeneizáveis

O número requerido de recipientes para guardar as amostras é delimitado como é indicado em 5.A.2., efectuar uma colheita pelo menos em cada recipiente após ter homogeneizado o conteúdo, se for necessário.

As colheitas elementares podem eventualmente ser efectuadas aquando da trasfega do produto.

6.2.A.4. Alimentos líquidos ou semilíquidos não homogeneizáveis

O número requerido de recipientes para guardar as amostras, é delimitado como é indicado em 5.A.2., recolher as amostras a diferentes níveis.

As colheitas podem igualmente ser efectuadas aquando da trasfega do produto depois de ter eliminado as primeiras fracções. Nos dois casos o volume total das colheitas não deve ser inferior a 10 litros.

6.2.A.5. Blocos minerais para lambr.

O número requerido de blocos minerais para guardar as amostras, é limitado como é indicado em 5.A.2., retirar uma parte de cada.

6.2.B. Destinados aos controlos de substâncias os produtos indesejáveis susceptíveis de ser repartidos não uniformemente nos alimentos, tais como aflatoxinas, cravagem de centeio, rícino, a crotalaria nos alimentos simples

Dividir simbolicamente o lote num número de partes aproximadamente iguais, correspondendo às das amostras globais previstas em 5.B.3. Quando o número é superior a um, repartir o número total das colheitas elementares previstas em 5.B.2. de maneira aproximadamente igual, em diferentes partes. Efectuar seguidamente as colheitas de massas aproximadamente iguais (5)() e de maneira a que a massa total das amostras, no que diz respeito a cada parte, não seja inferior à quantidade mínima de 4 quilos, requerida por cada amostra global. Não juntar as amostras elementares providas de partes diferentes.

6.3. Preparação das amostras globais

6.3.A. Destinadas aos controlos das substâncias ou produtos repartidos uniformemente nos alimentos

Reunir as colheitas elementares para constituírem uma só amostra global.

6.3.B. Destinadas aos controlos das substâncias ou produtos indesejáveis susceptíveis de ser repartidos não uniformemente nos alimentos, tais como as aflatoxinas a cravagem de centeio, rícino, a crotalaria nos alimentos simples

Reunir as recolhas elementares, relativas a cada parte do lote e constituir o número de amostras globais previsto em 5.B.3., tendo o cuidado de assinalar a proveniência de cada amostra global.

6.4. Preparação das amostras finais

Misturar cuidadosamente cada amostra global para obter uma amostra homogénea (6)() se necessário, reduzir para este efeito a amostra global até 2 quilos ou 2 litros pelo menos (amostra reduzida) quer com a ajuda dum divisor mecânico, quer pelo método dos quartos.

Preparar seguidamente pelo menos três amostros finais tendo aproximadamente a mesma massa ou o mesmo volume e respondendo às exigências quantitativas requeridas em 5.A.4. ou 5.B.4. Introduzir cada amostra num recipiente apropriado. Tomar todas as precauções necessárias para evitar qualquer modificação da composição de amostra cuja contaminação ou alteração possa ocorrer no decurso do transporte ou armazenagem.

6.5. Acondicionamento das amostras finais

Selar e etiquetar os recipientes ou as embalagens (a etiqueta deve ser incorporada no selo) de forma a que seja impossível abri-las sem deteriorar o selo.

7. ACTA DE AMOSTRAGEM

Por cada recolha de amostra estabelece uma acta de amostragem permitindo identificar sem ambiguidade o lote amostrado.

#### 8. DESTINO DAS AMOSTRAS

Por cada amostra global, transmitir pelo menos uma amostra final, o mais rapidamente possível, ao laboratório mandatado, para os fins de análise, com as indicações necessárias a essa análise.

(1)() Quando o número obtido é um número fraccionado, deve ser arredondado para o número inteiro imediatamente superior.(2)() Para as embalagens ou os recipientes cujo conteúdo não exceda um quilo ou um litro, assim como para os blocos minerais para lambrer cujo peso unitário não exceda um quilograma, o conteúdo duma embalagem onde um recipiente de origem, ou de um bloco mineral, constituem uma colheita elementar.(3)() Quando o número obtido é um número fraccionado, deve ser arredondado para o número inteiro imediatamente superior.(4)() As regras previstas no ponto 5.A. são de aplicação no controlo das aflatoxinas, da cravagem do centeio, do rícino, da crotalária nos alimentos completos e complementares.(5)() No caso dos alimentos embalados retirando uma parte do conteúdo das embalagens para coleccionar amostras com o auxílio de uma sonda ou duma pá eventualmente depois de ter esvaziado separadamente as embalagens.(6)() Se necessário esmagar os agregados (separando-os eventualmente da massa e reunindo em seguida o todo) separadamente para cada amostra global.

**SEGUNDA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 18 de Novembro de 1971 que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais (71/393/CEE)**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários, para o controlo oficial dos alimentos para animais (1) e, nomeadamente, o seu artigo 2º.,

Considerando que a Directiva acima referida prevê que, para verificar se são respeitadas as condições prescritas por força das disposições legislativas, regulamentares ou administrativas respeitantes à qualidade e composição dos alimentos para animais, os controlos oficiais dos elementos para animais sejam efectuados segundo os modos de colheita de amostras e os métodos de análise comunitários;

Considerando que a Directiva nº. 71/250/CEE de Comissão, de 15 de Junho de 1971(2), fixou já um certo número de métodos de análise comunitários ; que, tendo em conta o avanço dos trabalhos efectuados desde então, convém adoptar uma segunda série de métodos;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

**Artigo 1º.**

Os Estados-membros determinam que as análises para os controlos oficiais dos alimentos para animais no que diz respeito aos respectivos conteúdos de humidade, bases azotadas voláteis, fósforo total e matérias gordas brutas, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no anexo da presente directiva.

As disposições gerais constantes da Parte I do anexo (Introdução) da primeira Directiva nº. 71/250/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais são aplicáveis aos métodos descritos no anexo da presente directiva.

**Artigo 2º.**

Os Estados-membros porão em vigor, em 1 de Janeiro de 1973 o mais tardar, as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

**Artigo 3º.**

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 18 de Novembro de 1971.

Pelo Comissão

O Presidente

Franco M. Malfatti (1)JO nº. L 170 de 3.8.1970, p. 2. (2)JO nº. L 155 de 12.7.1971, p. 13.

**ANEXO**

**1. DOSAGEM DE HUMIDADE**

**1. Objecto e domínio de aplicação**

Este método permite determinar o teor de humidade dos alimentos para animais. Não diz respeito à análise dos produtos lácteos enquanto alimentos simples para animais, à análise das substâncias minerais e das misturas essencialmente compostas de substâncias minerais, assim como à análise das sementes e frutos oleaginosos definidos no Regulamento (CEE) nº. 136/66 do Conselho, de 22 de Setembro de 1966, que estabelece uma organização comum de mercado no sector das matérias gordas (1).

A determinação do teor de humidade das sementes e frutos oleaginosos é descrita no Anexo II do Regulamento (CEE) nº. 1470/68 da Comissão, de 23 de Setembro de 1968, relativo à toma e redução das amostras, assim como à determinação do teor de óleo, de impurezas e de humidade das sementes oleaginosas (2).

## 2. Princípio

A amostra é dessecada em condições definidas que variam em função da natureza do alimento. A perda de massa é determinada por pesagem. É necessário proceder a uma pré-dessecação sempre que se trate de alimentos sólidos com um elevado teor de humidade.

3. Instrumentos 3.1. Triturador construído num material que não absorva a humidade, fácil de limpar e que permita uma trituração rápida e uniforme sem provocar aquecimento sensível, que evite o mais possível o contacto com o ar exterior, e que satisfaça as exigências indicadas em (4.1.1.) e 4.1.2.) (por exemplo, microtritadores de martelos ou com arrefecimento por água, moinhos de cones desmontáveis, trituradores de movimento lento ou de discos dentados).

3.2. Balança analítica, com uma precisão de 0,5 mg.

3.3. Recipientes secos de metal inoxidável ou de vidro, munidos de uma tampa hermética ; superfície útil que permita obter uma repartição da amostra da ordem de 0,5 g por cm<sup>2</sup>.

3.4. Estufa isotérmica ( $\pm 1$  °C) de aquecimento eléctrico, com uma regulação rápida da temperatura e convenientemente ventilada (3).

3.5. Estufa a vácuo, com aquecimento eléctrico regulável, munida de uma bomba de óleo e, quer de um dispositivo de introdução de ar quente desidratado, quer de um desidratante por ex., óxido de cálcio).

Exsicador com placa de metal ou de porcelana espessa, perfurada, contendo um desidratante eficaz.

## 4. Modo operativo

NB : As operações descritas neste capítulo devem ser efectuadas imediatamente após a abertura das embalagens que contêm as amostras.

As análises devem ser efectuadas pelo menos em duplicado. (1)JO nº. 172 de 30.9.1966, p. 3025/66.

(2)JO nº. L 239 de 28.9.1968, p. 2. (3)Para dessecação dos cereais, assim como das farinhas e sêmolos grossas e finas, a estufa deve ter uma capacidade calorífica tal que, regulada previamente à temperatura de 131 °C, possa atingir de novo esta temperatura menos de 45 minutos após a colocação do número máximo de amostras a secar simultaneamente. A estufa deverá ainda ter uma ventilação tal que, secando durante 2 horas todas as amostras de trigo mole que pode conter, os resultados apresentem uma diferença inferior a 0,15 % relativamente aos resultados obtidos após quatro horas de dessecação.

4.1. Preparação 4.1.1. Alimentos com excepção dos mencionados em (4.1.2.) e (4.1.3.)

Recolher pelo menos 50 g da amostra. Se for necessário, tritar ou dividir de maneira apropriada para evitar qualquer variação do teor de humidade (ver 6).

4.1.2. Cereais e sêmolos grossos

Recolher pelo menos 50 g da amostra. Moer em partículas, das quais pelo menos 50 % passem por uma peneira de malhas de 0,5 mm e não deixem mais de 10 % de resíduos sobre outro crivo de malhas redondas de 1 mm.

4.1.3. Alimentos líquidos ou pastosos, alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas

Recolher e pesar, com uma aproximação de 10 mg, cerca de 25 g da amostra, adicionar-lhe uma quantidade apropriada de areia anidra, com uma aproximação de 10 mg misturar até à obtenção de um produto homogéneo.

4.2. Dessecação 4.2.1. Alimentos com excepção dos mencionados em (4.2.2.) e (4.2.3.)

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa previamente aquecida a 103 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa baixe muito, introduzir o recipiente num tempo mínimo. Deixar secar durante quatro horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 103 °C. Colocar a tampa sobre o recipiente, retirar este da estufa, deixar arrefecer durante 30 a 45 minutos no exsicador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg. No caso de alimentos constituídos essencialmente de matérias gordas, efectuar uma dessecação suplementar de 30 minutos na estufa a 103 °C. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder 0,1 % de humidade.

4.2.2. Cereais, farinhas sêmolos grossos

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra, repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa previamente aquecida a 130 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa desça demais introduzir o recipiente num tempo mínimo. Deixar secar durante duas horas, a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 130 °C. Colocar a tampa no recipiente, retirar este da estufa, deixar arrefecer 30 a 45 minutos no exsiccador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg.

4.2.3. Alimentos compostos contendo mais de 4 % de sacarose ou de lactose : alimentos simples tais como alfarroba, produtos cereais hidrolisados, germes de malte, rodela de beterraba, solutos de peixe e açúcares ; alimentos compostos com mais de 25 % de sais minerais contendo água de cristalização

Tarar, com uma aproximação de 0,5 g, um recipiente (3.3.) com a tampa. Pesar dentro dele, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 5 g da amostra repartindo-a uniformemente. Colocar o recipiente na estufa de vácuo (3.5.) previamente aquecida à temperatura de 80 a 85 °C, com a tampa tirada. Para evitar que a temperatura da estufa não desça demais, introduzir o recipiente num tempo mínimo.

Eleva a pressão a 100 Torr e deixar secar a esta pressão durante quatro horas, quer sob uma corrente de ar seco e quente, quer por meio de um desidratante (cerca de 300 g para 20 amostras). Neste último caso, cortar a ligação com a bomba de vácuo quando se atingir a pressão prescrita. Contar a duração da secagem a partir do momento em que a estufa tiver atingido de novo a temperatura de 80 a 85 °C. Levantar em seguida com precaução a estufa até à pressão atmosférica. Abrir a estufa, cobrir imediatamente o recipiente com a tampa, retirá-lo da estufa, deixar arrefecer durante 30 a 45 minutos no exsiccador (3.6.) e pesar com uma aproximação de 1 mg. Proceder a uma secagem complementar de 30 minutos na estufa a vácuo à temperatura de 80 a 85 °C e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens não deve exceder 0,1 % de humidade.

#### 4.3. Pré-dessecação 4.3.1. Alimentos, com excepção dos mencionados em (4.3.2.)

Os alimentos sólidos cujo teor de humidade é elevado e torna a trituração difícil, devem ser pré-dessecados como se segue:

Pesar, com uma aproximação de 10 mg, 50 g de amostra não triturada (pode efectuar-se uma divisão grosseira, se necessário, no caso dos alimentos comprimidos ou aglomerados) num recipiente apropriado (por exemplo, numa placa de alumínio de 20 X 12 cm com um bordo de 0,5 cm). Deixar secar numa estufa à temperatura de 60 a 70 °C até que o teor de humidade seja baixado até um valor entre 8 e 12 %. Retirar da estufa, deixar arrefecer a descoberto no laboratório durante 1 hora, e pesar com uma aproximação de 10 mg. Triturar imediatamente, como indicado em (4.1.1.) e efectuar a dessecação como indicado em (4.2.1.) ou (4.2.3.) segundo a natureza do alimento.

#### 4.3.2. Cereais

As sementes com uma taxa de humidade superior a 17 % devem ser pré-dessecadas como se segue:

Pesar, com uma aproximação de 10 mg, 50 g de sementes não moídas num recipiente apropriado (por exemplo, numa placa de alumínio de 20 X 12 cm com bordo de 0,5 cm). Deixar secar numa estufa durante 5 a 7 minutos, à temperatura de 130 °C. Retirar da estufa, deixar arrefecer a descoberto no laboratório durante duas horas e pesar, com uma aproximação de 10 mg. Moer imediatamente, como indicado em (4.1.2.) e efectuar a dessecação, como indicado em (4.2.2.).

### 5. Cálculo dos resultados

O teor de humidade, em percentagem da amostra, é dado pelas seguintes fórmulas: 5.1. Dessecação sem pré-dessecação >PIC FILE= "T0002775">

em que:

E = massa inicial da amostra, em gramas,

m = massa da amostra dessecada em gramas.

5.2. Dessecação com pré-dessecação >PIC FILE= "T0002776">

em que:

E = massa inicial da amostra, em gramas,

M = massa da amostra, depois da pré-dessecação, em gramas,

M' = massa da amostra depois da trituração ou moedura, em gramas,

m = massa da amostra seca, em gramas.

#### 5.3. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,2 % de humidade.

## 6. Observações

Se for necessário uma trituração e dela resultar uma variação do teor de humidade do produto, os resultados da análise que dizem respeito aos componentes do alimento devem ser convertidos de acordo com o teor de humidade da amostra inicial.

## 2. DOSEAMENTO DAS BASES AZOTADAS VOLÁTEIS

### A. POR MICRODIFUSÃO

#### 1. Objecto e domínio de aplicação

O método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis, expressas em amoníaco, dos alimentos para animais.

#### 2. Princípio

A amostra é extraída com água e a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis são extraídas por microdifusão, por meio de uma solução de carbonato de potássio, recolhidas numa solução de ácido bórico e tituladas com ácido sulfúrico.

3. Reagentes 3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.

3.2. Indicador : dissolver 33 mg de verde de bromocresol e 65 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol a 95-96 % (v/v).

3.3. Solução de ácido bórico : num balão aferido de 1 litro, dissolver 10 g de ácido bórico p.a. em 200 ml de etanol a 95-96 % (v/v) e 700 ml de água. Juntar 10 ml de indicador (3.2.). Misturar e, se necessário, ajustar a coloração da solução a vermelho claro, por adição de uma solução de hidróxido de sódio. 1 ml desta solução permite fixar, no máximo, 300 µg de NH<sub>3</sub>.

3.4. Solução saturada de carbonato de potássio : dissolver 100 g de carbonato de potássio p.a. em 100 ml de água em ebulição. Deixar arrefecer e filtrar.

3.5. Ácido sulfúrico 0,02 N.

4. Instrumentos 4.1. Misturador basculante : cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

4.2. Células de Conway (v. esquema) e de vidro ou matéria plástica.

4.3. Microburetas, graduadas em 1/100 ml.

## 5. Modo operativo

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g de amostra e introduzir num balão aferido de 200 ml com 100 ml de água. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 50 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1.), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Introduzir com a pipeta, na parte central da célula de Conway, 1 ml de solução de ácido bórico (3.3.) e na parte periférica, 1 ml do filtrado da amostra. Cobrir parcialmente com a tampa com silicone. Introduzir rapidamente na parte periférica 1 ml de solução saturada de carbonato de potássio (3.4.) e fechar hermeticamente a tampa. Agitar suavemente a célula dando-lhe um movimento de rotação num plano horizontal, para misturar os dois reagentes. Deixar incubar durante quatro horas, pelo menos, à temperatura ambiente, ou, então, durante 1 hora a 40 °C.

Titular as bases voláteis na solução de ácido bórico por meio de ácido sulfúrico 0,02 N (3.5.), utilizando uma microbureta (4.3.).

Efectuar um ensaio em branco utilizando o mesmo método na ausência de amostra a analisar.

## 6. Cálculo dos resultados

1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

### Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas com a mesma amostra, não deve ultrapassar:

10 % em valor relativo, para os teores de amoníaco inferiores a 1,0 %;

0,1 em valor absoluto para os teores de amoníaco iguais ou superiores a 1,0 %.

## 7. Observações

Se o teor de amoníaco da amostra for superior a 0,6 %, diluir o filtrado inicial.

>PIC FILE= "T0002777">

### B. POR DESTILAÇÃO

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de bases azotadas voláteis expressas em amoníaco das farinhas de peixe que praticamente não contêm ureia. Só pode ser utilizado para os teores de amoníaco inferiores a 0,25 %.

### 2. Princípio

A amostra é extraída com água, a solução é clarificada e filtrada. As bases azotadas voláteis extraídas, em ebulição, por adição de óxido de magnésio e recolhidas numa quantidade determinada de ácido sulfúrico cujo excesso é titulado por meio de uma solução de hidróxido de sódio.

3. Reagentes 3.1. Solução a 20 % (p/v) de ácido tricloroacético.

3.2. Óxido de magnésio p.a.

3.3. Emulsão de antiespuma (silicone por ex.).

3.4. Ácido sulfúrico 0,1 N.

3.5. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

3.6. Solução a 0,3 % (p/v) de vermelho de metilo em etanol a 95-96 % (v/v).

4. Instrumentos 4.1. Misturador basculante : cerca de 35 a 40 rotações por minuto.

4.2. Aparelho de destilação do tipo Kjeldahl.

### 5. Método

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 10 g da amostra e introduzir, com 100 ml de água, num balão aferido de 200 ml. Misturar durante 30 minutos no misturador basculante. Adicionar 50 ml de solução de ácido tricloroacético (3.1), completar o volume com água, agitar vigorosamente e filtrar num filtro de pregas.

Recolher uma quantidade do filtrado límpido em função da concentração teórica de bases azotadas voláteis (geralmente 100 ml). Diluir para 200 ml e adicionar 2 g de óxido de magnésio (3.2.) e algumas gotas de emulsão anti-espuma (3.3.). O PH da solução deve ser alcalino quando verificado com papel tornesol ; se não o for, adicionar mais óxido de magnésio (3.2.). Destilar cerca de 150 ml da solução num aparelho do tipo Kjeldahl, e recolher o destilado num erlenmeyer contendo um volume, exactamente medio (25 a 50 ml), de ácido sulfúrico 0,1 N (3.4.). Durante a destilação evitar um sobreaquecimento das paredes. Deixar ferver a solução sulfúrica durante dois minutos, arrefecer, e titular o excesso de ácido sulfúrico por meio de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.5.), em presença do indicador vermelho de metilo (3.6.).

Efectuar um ensaio em branco aplicando o mesmo método, na ausência de amostra a analisar.

### 6. Cálculo dos resultados

1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar, em valor relativo, 10 % de amoníaco.

## 3. DOSEAMENTO DO FÓSFORO TOTAL

Método fotométrico

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de fósforo total dos alimentos para animais. É particularmente indicado para a análise de produtos pobres em fósforo. Nalguns casos (produtos ricos em fósforo), pode ser aplicado um método gravimétrico.

### 2. Princípio

A amostra é mineralizada, quer por via seca (para os alimentos argânicos) quer por via húmida (para os compostos minerais e os alimentos líquidos) e posta em solução ácida. A solução é tratada pelo reagente vanadomolibdico. A densidade óptica da solução amarela assim formada é medida em espectrofotómetro a 430 nm.

3. Reagentes 3.1. Carbonato de cálcio p.a.

3.2. Ácido clorídrico p.a., d : 1,1 (cerca de 6 N).

3.3. Ácido azótico p.a., d : 1,045.

3.4. Ácido azótico p.a., d : 1,38 a 1,42.

3.5. Ácido sulfúrico p.a., d : 1,84.

3.6. Reagente vanadomolibdico : misturar 200 ml de solução de heptamolibdato de amônio (3.6.1.), 200 ml de solução de monovanadato de amônio (3.6.2.) e 134 ml de ácido azótico (3.4.) num balão aferido de 1 litro. Completar o volume com água. 3.6.1. Solução de heptamolibdato de amônio : dissolver em água quente 100 g de heptamolibdato de amônio p.a.  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Intar 10 ml de amoníaco (d : 0,91) e completar para 1 l com água.

3.6.2. Solução de monovanadato de amonio : dissolver em 400 ml de água quente, 2,35 g de monovanadato de amônio p.a.  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ . Adicionar lentamente, e agitando sempre, 20 ml de ácido azótico diluído (7 ml de  $\text{HNO}_3$  (3.4.) + 13 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ) e completar a 1 l com água.

3.7. Solução-padrão a 1 mg/ml de fósforo : dissolver em água 4,387 g de fósfo de potássio didrogenado p.a.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Completar para 1 l com água.

4. Instrumentos 4.1. Cadinhos de incineração de quartzo ou porcelana.

4.2. Mufla eléctrica com termostato regulado a 550 °C.

4.3. Retorta de Kjeldahl, 250 ml.

4.4. Balões aferidos e pipetas de precisão.

4.5. Espectrofotómetro.

4.6. Tubos de ensaio, diâmetro : cerca de 16 mm, de rosca normalizada 14,5 ; capacidade : 25 a 30 ml.

5. Modo operativo 5.1. Preparação da solução

Consoante a natureza da amostra, preparar uma solução tal como indicado em (5.1.1. ou 5.1.2.). 5.1.1. Caso geral

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 1 g de amostra. Introduzir a amostra numa retorta de Kjeldahl, adicionar 20 ml de ácido sulfúrico (3.5.) agitar para impregnar completamente a matéria de ácido e evitar que adira às paredes do balão, aquecer e manter em ebulição durante 10 minutos. Deixar arrefecer ligeiramente, adicionar 2 ml de ácido azótico (3.4.), aquecer lentamente, deixar arrefecer ligeiramente, juntar de novo um pouco de ácido azótico (3.4.) e fazer ferver. Repetir estas operações até à obtenção de uma solução incolor. Arrefecer, juntar um pouco de água, transvasar o líquido num balão aferido de 500 ml, passando a retorta por água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.1.2. Amostras contendo matérias orgânicas e isentas de didrogenofosfatos de cálcio e de magnésio

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, cerca de 2,5 g de amostra num cadinho de incineração. Misturar intimamente a amostra a 1 g de carbonato de cálcio (3.1.). Calcinar na mufla a 550 °C  $\pm$  5 °C até à obtenção de cinzas brancas ou cinzentas (uma pequena quantidade de carvão não prejudica).

Transvasar as cinzas num copo de precipitação de 250 ml. Juntar 20 ml de água e de ácido clorídrico (3.2.) até que cesse a efervescência. Juntar em seguida 10 ml de ácido clorídrico (3.2.) em excesso. Colocar o copo num banho de areia e evaporar a seco para insolubilizar o silício. Retomar o resíduo por meio de 10 ml de ácido azótico (3.3.) e fazer ferver, durante 5 minutos num banho de areia, sem evaporar a seco. Transvasar o líquido num balão aferido de 500 ml lavando o copo de precipitação várias vezes a água quente. Deixar arrefecer, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar.

5.2. Desenvolvimento da coloração e medição da densidade óptica.

Diluir uma alíquota do filtrado obtido em (5.1.1.) ou (5.1.2.) para obter uma concentração em fósforo não superior a 40 µg/ml. Introduzir 10 ml desta solução num tubo de ensaio (4.6.) e adicionar 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos à temperatura de 20 °C. Medir a densidade óptica em espectrofotómetro a 430 nm por comparação com uma solução obtida por adição de 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.) a 10 ml de água.

5.3. Curva-padrão

Preparar a partir da solução-padrão (3.7.) soluções contendo respectivamente 5, 10, 20, 30 e 40 µg de fósforo por ml. Recolher 10 ml de cada uma destas soluções e juntar-lhes 10 ml do reagente vanadomolibdico (3.6.). Homogeneizar e deixar repousar 10 minutos, pelo menos, à temperatura de 20 °C. Medir as densidades ópticas nas condições indicadas em (5.2.).

Traçar a curva-padrão marcando em ordenadas os valores da densidade óptica e, em abcissas, as quantidades correspondentes de fósforo. A curva é linear para as concentrações compreendidas entre 0 e 40 µg/ml.

6. Cálculo dos resultados

Determinar a quantidade de fósforo da amostra por referência à curva-padrão.



Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

3 % em valor relativo para os teores de fósforo inferiores a 5 %;

0,15 em valor absoluto para os teores de fósforo iguais ou superiores a 5 %.

#### 4. DOSEAMENTO DAS MATÉRIAS GORDAS BRUTAS

##### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de matérias gordas brutas de alimentos para animais. Não se refere à análise das sementes e frutos oleaginosos definidos no Regulamento 136/66/CEE do Conselho, de 22 de Setembro de 1966. A determinação do teor de óleo desses produtos é objecto do Anexo V do Regulamento (CEE) nº 1470/68 da Comissão, de 23 de Setembro de 1968.

Duas técnicas estão previstas em função da natureza do alimento. 1.1. Método A (extracção pelo éter) : aplicado a todos os alimentos, salvo aos mencionados em (1.2.).

1.2. Método B : aplicado aos alimentos cujas matérias gordas não podem ser totalmente extraídas por éter dietílico sem hidrólise prévia, aos alimentos de origem animal, glúten, polpas secas de batata, resíduos secos das indústrias de cerveja e de destilaria, leveduras secas, desperdícios de bolachas, pães e alimentos cozidos, produtos lácteos e alimentos contendo uma forte proporção dos mesmos (pelo menos 40 %), e aos alimentos compostos enriquecidos em gorduras.

2. Princípio 2.1. Método A : as matérias gordas são extraídas pelo éter dietílico. O solvente é eliminado e o resíduo é seco e pesado.

2.2. Método B : a amostra é hidrolisada a quente pelo ácido clorídrico. A solução é arrefecida e filtrada. O resíduo, lavado e seco, é submetido à extracção pelo éter dietílico segundo o Método A.

3. Reagentes 3.1. Éter dietílico, anidro,  $d : 0,720$ , p. e. :  $34,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , praticamente isento de peróxidos.

3.2. Sulfato de sódio p.a., anidro.

3.3. Ácido clorídrico 3 N.

3.4. Adjuvante de filtração, por ex. terra de diatomáceas, Hyflo-superpel.

3.5. Tetracloroeto de carbono p.a.

4. Instrumentos 4.1. Extractor segundo Soxhlet ou aparelho equivalente.

4.2. Aparelho de aquecimento com temperatura regulável antideflagrante.

4.3. Estufa de dessecação por vácuo (menos de 100 Torr).

##### 5. Modo operativo 5.1. Método A (ver observação 7.1.)

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 5 g de amostra e misturá-la a 2 a 3 g (ou mais, se necessário) de sulfato de sódio anidro (3.2.). Introduzir a mistura num cone de extracção isento de matérias gordas e cobrir com uma rolha de algodão desengordurado. (A mistura pode fazer-se eventualmente no cone.)

Colocar o cone num extractor (4.1.) e extrair durante seis horas pelo éter dietílico (3.1.). Se se utiliza um extractor segundo Soxhlet, regular o aquecimento para obter pelo menos 15 ciclos por hora. Recolher o extracto num balão seco com alguns fragmentos de pedra-pomes (1) e tarado. (1)Substituir os fragmentos de pedra-pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames qualitativos posteriores.

Eliminar o éter por destilação e secar em seguida o resíduo de evaporação durante uma hora e meia na estufa de dessecação por vácuo (4.3.) à temperatura de  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Arrefecer num exsiccador e pesar.

Efectuar uma segunda dessecação durante 30 minutos para ter a certeza de que o peso da matéria gorda se mantém constante (a perda de peso deve ser inferior a 1 mg).

##### 5.2. Método B

Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 2,5 g de amostra (ver observação 7.2.) e introduzir num copo de precipitação de 400 ml ou num erlenmeyer de 300 ml. Adicionar 100 ml de ácido clorídrico 3 N (3.3.) e alguns fragmentos de pedra-pomes. Cobrir o copo com um vidro de relógio ou munir o erlenmeyer de um refrigerador de refluxo. Deixar ferver suavemente uma hora, à chama fraca ou sobre uma placa de aquecimento. Evitar que o produto adira às paredes do recipiente.

Arrefecer e adicionar uma quantidade de adjuvante de filtração (3.4.) suficiente para evitar qualquer perda de matéria gorda na filtração. Filtrar num filtro de papel duplo molhado e isento de matérias gordas. Lavar o resíduo com água fria até ao desaparecimento da reacção ácida. Verificar que o filtrado não contém matérias gordas. A presença destas no filtrado indica que antes da hidrólise deve ser efectuada uma extracção da amostra por éter dietílico, segundo o método indicado em (5.1.). Colocar o filtro contendo o resíduo num vidro de relógio, secar durante uma hora e meia na estufa a uma temperatura de 95 a 98 °C.

Introduzir o filtro e o resíduo seco num cone de extracção, extrair pelo éter dietílico, e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo parágrafo.

## 6. Cálculo dos resultados

Exprimir o resultado em percentagem da amostra.

### Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,3 % de matéria gordas.

7. Observações 7.1. Para os produtos de elevado teor de matérias gordas, difíceis de triturar ou não adequados à colheita de uma amostra reduzida e homogénea, proceder como se segue. Pesar, com uma aproximação de 1 mg, 20 g de amostra e misturá-las com 10 g ou mais de sulfato de sódio anidro (3.2.). Proceder à extracção pelo éter dietílico (3.1.) como indicado em (5.1.). Completar o extracto obtido para 500 ml com tetracloreto de carbono (3.5.) e homogeneizar. Recolher 50 ml da solução num pequeno balão seco, com alguns fragmentos de pedra-pomes (1) e tarado. Eliminar o solvente por destilação, secar e prosseguir como indicado em (5.1.) último parágrafo. Eliminar o solvente do resíduo de extracção que se encontra no cone, e triturar o resíduo até um calibre de 1 mm. Colocar de novo o produto no cone de extracção (não adicionar sulfato de sódio) extrair pelo éter dietílico e prosseguir como indicado em (5.1.), segundo e terceiro parágrafos.

Calcular o resultado em percentagem da amostra, tendo em conta a alíquota utilizada aquando da primeira extracção, segundo a fórmula seguinte:

$$(10a + b) \div 5$$

em que

a = extracto etéreo em gramas da alíquota, depois da primeira extracção,

b = extracto etéreo em gramas depois da segunda extracção.

7.2. A amostra de produtos pobres em matérias gordas pode ser elevado a 5 g. (1) Substituir os fragmentos de pedra-pomes por pérolas de vidro sempre que a matéria gorda deva ser objecto de exames qualitativos posteriores.

**TERCEIRA DIRECTIVA DA COMISSÃO de 27 de Abril de 1972 que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo dos alimentos para animais**

(72/199/CEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitárias para o controlo oficial de alimentos para animais (1) e, nomeadamente, o seu artigo 2o,

Considerando que a directiva atrás referida prevê que os controlos oficiais dos alimentos para animais, para verificar se as condições prescritas em virtudes de disposições legislativas, regulamentares ou administrativas referentes à qualidade e composição de alimentos para animais, são respeitados e efectuados segundo modos de colheita de amostra e métodos de análise comunitários;

Considerando que as Directivas nos 71/250/CEE e 71/393/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971 (2) e de 18 de Novembro de 1971 (3), fixaram já um certo número de métodos de análise comunitários; que, tendo em conta o estado de evolução dos trabalhos efectuados desde então, é conveniente adoptar uma terceira série de métodos;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão conformes com o parecer do Comité Permanente dos Alimentos para Animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

**Artigo 1o**

Os Estados-membros determinaram que as análises para os controlos oficiais de alimentos para animais, no que respeita ao teor de amido, proteínas brutas solubilizáveis pela pepsina e pelo ácido clorídrico e de gossipol livre e total, assim como à actividade da pepsina, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no Anexo I da presente directiva.

As disposições gerais, que constam da Parte I (Introdução) do Anexo da primeira directiva no 71/250/CEE da Comissão, de 15 de Junho de 1971, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais, são aplicáveis aos métodos descritos no Anexo I da presente directiva.

**Artigo 2o**

Os Estados-membros determinarão que as análises para os controlos oficiais dos alimentos para animais com vista à detecção e identificação dos antibióticos do grupo das tetraciclina, assim como o que respeita ao teor de clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, oleandomicina, tilosina, virginiamicina, sejam efectuadas segundo os métodos descritos no Anexo II da presente directiva.

**Artigo 3o**

Os Estados-membros porão em vigor em 1 de Julho de 1973, o mais tardar, as disposições legislativas, regulamentares ou administrativas necessárias para darem cumprimento às disposições da presente directiva. Deste facto informarão imediatamente a Comissão.

**Artigo 4o**

Os Estados-membros são destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas em 27 de Abril de 1972.

Pela Comissão

O Presidente

S. L. MANSHOLT

(1) JO no L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.(2) JO no L 155 de 12. 7. 1971, p. 13.(3) JO no L 279 de 20. 12. 1971, p. 7.

## ANEXO I

### 1. DOSEAMENTO DO AMIDO

- Método polarimétrico -

#### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar o teor de amido e de produtos de degradação deste, de alto peso molecular dos alimentos para animais, com excepção dos que contenham tiras, polpa, folhas ou colos secos de beterraba, polpa de batata, leveduras desidratadas, produtos ricos em inulina (por exemplo, tiras e farinhas de tupinambos) ou de torresmos.

#### 2. Princípio

O método inclui uma dupla determinação. Na primeira, a amostra é tratada a quente por ácido clorídrico diluído. Depois da clarificação e filtração, mede-se por polarimetria o poder rotatório da solução.

Na segunda, a amostra é extraída por etanol a 40 %. Depois da acidificação do filtrado pelo ácido clorídrico, da clarificação e filtração, mede-se o poder rotatório nas mesmas condições da primeira determinação.

A diferença entre as duas, multiplicada por um factor conhecido dá o teor de amido da amostra.

#### 3. Reagentes

3.1. Ácido clorídrico a 25 % (p/p), d: 1,126.

3.2. Ácido clorídrico a 1,128 % (p/v).

A concentração deve ser verificada por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N em presença de vermelho de metilo a 0,1 % (p/v) em etanol a 94 % (v/v). 10 ml = 30,94 ml de NaOH 0,1 N.

3.3. Solução de Carrez I: dissolver em água 21,9 g de acetato de zinco  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 3 g de ácido acético glacial. Completar até 100 ml com água.

3.4. Solução de Carrez II: dissolver em água 10,6 g de ferrocianeto de potássio  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Completar até 100 ml com água.

3.5. Etanol a 40 % (v/v), d: 0,948 a 20 ° C.

#### 4. Instrumentos

4.1. Erlenmeyer de 250 ml de colo esmerilado normalizado com refrigerador de refluxo.

4.2. Polarímetro ou sacarímetro.

#### 5. Modo operativo

##### 5.1. Preparação de amostra

Triturar a amostra de maneira a passar a totalidade através de um crivo de malha redonda de 0,5 mm de diâmetro.

##### 5.2. Determinação do poder rotatório total (P ou S) (v. observação 7.1.)

Pesar com a aproximação de 1 mg, 5 g de amostra triturada e introduzir num balão aferido de 100 ml. Adicionar 25 ml de ácido clorídrico (3.2.), agitar para obter uma boa repartição da amostra e adicionar novamente 25 ml de ácido clorídrico. Introduzir o balão num banho-maria em ebulição e, durante três minutos, agitar enérgica e regularmente para evitar a formação de aglomerados. A quantidade de água do banho deve ser suficiente para permitir mantê-lo em ebulição quando o balão é introduzido. Este não pode ser retirado do banho durante a agitação. Exactamente quinze minutos depois, retirar o balão do banho, juntar-lhe 30 ml de água fria e arrefecer imediatamente a 20 ° C.

Adicionar 5 ml de solução de Carrez I (3.3.) e agitar durante um minuto. Adicionar em seguida 5 ml de solução de Carrez II (3.4.) e agitar de novo durante um minuto. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Se o filtrado não ficar perfeitamente límpido (o que é pouco frequente) recomeçar a análise utilizando uma quantidade maior das soluções de Carrez I e II, por exemplo, 10 ml.

Medir em seguida o poder rotatório da solução num tubo de 200 mm no polarímetro ou no sacarímetro.

##### 5.3. Determinação do poder rotatório (P' ou S') de substâncias solúveis em etanol a 40 %

Introduzir num balão aferido de 100 ml 5 g de amostra, pesada com a aproximação de 1 mg e adicionar cerca de 80 ml de etanol (3.5.) (v. observação 7.2.). Deixar o balão à temperatura ambiente durante 1 hora; durante esse lapso de tempo, agitar energicamente 6 vezes, de maneira a que a amostra fique bem misturada com o etanol. Completar até 100 ml com etanol (3.5.), homogeneizar e filtrar.

Introduzir com uma pipeta 50 ml de filtrado (= 2,5 g de amostra) num erlenmeyer de 250 ml, adicionar 2,1 ml de ácido clorídrico (3.1.) e agitar energicamente. Aplicar um refrigerador de refluxo ao erlenmeyer e mergulhar este num banho-maria em ebulição. Exactamente 15 minutos depois, retirar o erlenmeyer do banho, despejar o seu conteúdo num balão aferido de 100 ml, passando por um pouco de água fria e arrefecer a 20 ° C. Clarificar em seguida com as soluções de Carrez I (3.3.) e II (3.4.), completar o volume com água, homogeneizar, filtrar e medir o poder rotatório como indicado em (5.2.), 2o e 3o parágrafos.

## 6. Cálculo dos resultados

O teor de amido, em percentagem de amostra, é calculado como se segue:

### 6.1. Medições efectuadas no polarímetro

percentagem de amido = a

P = poder rotatório em graus de arco

P' = poder rotatório em graus de arco dados pelas substâncias solúveis em etanol a 40 %

[ a ] 20°D = poder rotatório específico do amido puro. Os valores convencionalmente admitidos para este factor são os seguintes:

+ 185,9 °: amido de arroz

+ 185,4 °: amido de batata

+ 184,6 °: amido de milho

+ 182,7 °: amido de trigo

+ 181,5 °: amido de cevada

+ 181,3 °: amido de aveia

+ 184,0 °: outros tipos de amidos, assim como misturas de amidos de alimentos compostos

### 6.2. Medidas efectuadas no sacarímetro

percentagem de amido = a · a = a

S = poder rotatório total em graus sacarimétricos

S' = poder rotatório em graus sacarimétricos, dados pelas substâncias solúveis em etanol a 40 %.

N = peso em gramas de sacarose, em 100 ml de água que, através de uma espessura de 200 mm, dê um poder rotatório de 100 ° sacarimétricos.

16,29 g para os sacarímetros franceses

26,00 g para os sacarímetros alemães

20,00 g para os sacarímetros mistos

[ a ] 20°D = Poder rotatório específico do amido puro (ver 6.1).

### 6.3. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 0,4, em valor absoluto, para os teores de amido inferiores a 40 %, e 1,1 % em valor relativo para os teores de amido iguais ou superiores a 40 %.

## 7. Observações

7.1. Sempre que a amostra contenha mais de 6 % de carbonatos, calculados em carbonato de cálcio, estes devem ser destruídos por um tratamento com a quantidade apropriada de ácido sulfúrico diluído, antes da determinação do poder rotatório total.

7.2. No caso de produtos com forte teor de lactose, tais como soro de leite em pó ou de nata de leite em pó, proceder como se segue, depois da adição de 80 ml de etanol (3.5.). Aplicar ao balão um refrigerador de refluxo, mergulhar o balão durante 30 minutos num banho de água a 50 ° C. Em seguida, deixar arrefecer e prosseguir a análise como indicado em (5.3.).

## 2. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS BRUTAS

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar convencionalmente o teor de proteínas brutas de alimentos para animais, a partir do teor de azoto, doseado segundo Kjeldahl.

### 2. Princípio

A amostra é mineralizada por via húmida. A solução ácida é alcalinizada por uma solução de hidróxido de sódio. O amoníaco libertado é preparado por destilação e recolhido numa quantidade determinada de ácido sulfúrico cujo excesso é titulado por uma solução de hidróxido de sódio.

### 3. Reagentes

3.1. Sulfato de potássio p.a.

3.2. Catalisador: óxido cúprico  $\text{CuO}$  p.a., o sulfato cúprico cristalizado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  p.a., o mercúrio, u óxido mercúrico  $\text{HgO}$  p.a.

3.3. Zinco p.a., granulado

3.4. Ácido sulfúrico p.a., d: 1,84

3.5. Ácido sulfúrico 0,1 N.

3.6. Ácido sulfúrico 0,5 N.

3.7. Indicador vermelho de metilo: dissolver 300 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol a 95-96 % (v/v).

3.8. Solução a 40 % (p/v) de hidróxido de sódio.

3.9. Solução de hidróxido de sódio 0,1 N

3.10. Solução de hidróxido de sódio 0,25 N

3.11. Solução saturada de sulfureto de sódio p.a.

3.12. Solução a 8 % (p/v) de tiosulfato de sódio,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  p.a.

3.13. Pedra pomes granulada, lavada com ácido clorídrico e calcinada

### 4. Instrumentos

Aparelhos de mineralização e destilação, segundo Kjeldahl (v. observação 7.1.).

### 5. Modo operatório

#### 5.1. Mineralização

Introduzir 1 g de amostra, pesada com a aproximação de 1 mg no balão do aparelho de mineralização. Juntar 10 g de sulfato de potássio (3.1.), uma quantidade apropriada de catalizador (3.2.) (0,3 a 0,4 g de óxido cúprico ou 0,9 a 1,2 g de sulfato de cobre ou uma gota de mercúrio, ou 0,6 a 0,7 g de óxido de mercúrio), 25 ml de ácido sulfúrico (3.4.) e alguns grânulos de pedra pomes (3.13.). Homogeneizar. Aquecer o balão, primeiro com moderação e agitando de tempos a tempos até à carbonização de massa e desaparecimento da espuma; em seguida, mais intensamente, até à ebulição regular do líquido. Evitar o sobreaquecimento das paredes e a aderência de partículas orgânicas. Quando a solução aprezer límpida e incolor (verde claro em presença do catalizador à base de cobre), manter a ebulição ainda durante 1 hora. Em seguida, deixar arrefecer.

#### 5.2. Destilação

Adicionar 250 a 350 ml de água, com precaução, agitando sempre para dissolver completamente os sulfatos; deixar arrefecer.

Adicionar em seguida alguns grânulos de zinco (3.3.)

Introduzir no frasco colector do aparelho de destilação 25 ml, exactamente medidos, de ácido sulfúrico 0,1 N (3.5.) ou 0,5 N (3.6.) conforme a concentração teórica de azoto (v. observação 7.2.) e algumas gotas do indicador vermelho de metilo (3.7.).

Ligar o balão ao refrigerador do aparelho de destilação e mergulhar a extremidade deste último no líquido do frasco colector pelo menos 1 cm (ver observação 7.3.). Introduzir lentamente no balão através do funil com torneira, 100 ml de solução a 40 % de hidróxido de sódio (3.8.). Se se tiver utilizado um catalizador à base de mercúrio, introduzir, além disso, no balão quer 10 ml de solução de sulfureto de sódio (3.11.), quer 25 ml de solução de tiosulfato de sódio (3.12.).

Aquecer a balão de forma a destilar cerca de 150 ml de líquido em 30 minutos. Depois desse lapso de tempo, verificar o carácter neutro do líquido destilado por meio de papel tornesol. Se a reacção for alcalina, prosseguir a destilação. Pará-la, quando o líquido destilado aparecer neutro no papel tornesol. Durante a destilação, agitar de tempos a tempos o conteúdo do frasco colector e vigiar a sua coloração. Se esta virar para amarelo, juntar imediatamente um volume, exactamente medido, de ácido sulfúrico 0,1 N (3.5.) ou 0,5 N (3.6.).

#### 5.3. Titulação

Titular no frasco colector o excesso de ácido sulfúrico com a solução de hidróxido de sódio 0,1 N (3.9.) ou 0,25 N (3.10.), conforme a normalidade do ácido sulfúrico utilizado, até à virança de coloração para amarelo claro.

#### 5.4. Controlo do método

Para verificar se os reagentes estão isentos de azoto, efectuar um ensaio em branco (destilação e titulação) na ausência da amostra a analisar. Para controlar a exactidão do método, efectuar a análise (mineralização, destilação e titulação) em 1,5 a 2,0 g de acetanilida p.a. (P.F. 114 ° C; % N: 10,36) na presença de 1 g de sacarose, livre de azoto; 1 g acetanilida consome 14,80 ml de ácido sulfúrico 0,5 N.

#### 6. Cálculo dos resultados

Determinar o volume de ácido sulfúrico consumido, correspondendo 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N a 1,4 mg de azoto. Multiplicar a quantidade de azoto pelo factor 6,25. Expressar o resultado em percentagem de amostra.

#### Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

- 0,2 em valor absoluto, para os teores de proteínas brutas inferiores a 20 %,
- 1,0 % em valor relativo, para os teores compreendidos entre 20 e 40 %,
- 0,4 em valor absoluto, para os teores superiores a 40 %.

#### 7. Observações

7.1. Podem ser utilizados certos aparelhos que exigem um transvasamento entre a mineralização e a destilação. Neste caso, o transvasamento deve ser efectuado sem perdas.

7.2. Em relação aos produtos pobres em matérias azotadas, o volume de ácido sulfúrico 0,1 N a introduzir no frasco colector pode ser reduzido, se necessário, a 10 ou 15 ml, e completado com água até 25 ml.

7.3. Se o balão do destilador não tiver um funil com torneira, juntar a solução de hidróxido de sódio imediatamente antes de ligar o balão ao refrigerador, deixando correr o líquido lentamente ao longo das paredes, de maneira a evitar que se misture à solução ácida.

### 3. DOSEAMENTO DE PROTEÍNAS BRUTAS SOLUBILIZADAS PELA PEPSINA E PELO ÁCIDO CLORÍDRICO

#### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite determinar a fracção de proteínas brutas solubilizadas pela pepsina e pelo ácido clorídrico em condições determinadas. O método é aplicável a todos os alimentos.

#### 2. Princípio

A mostra é submetida a um tratamento por uma solução clorídrica de pepsina durante 48 h a 40 ° C. A suspensão é filtrada e o teor de azoto do filtrado determinado segundo o método descrito para o doseamento das proteínas brutas.

#### 3. Reagentes

3.1. Ácido clorídrico, d: 1,125

3.2. Ácido clorídrico: 0,075 N.

3.3. Pepsina a 2,0 U/mg; esta actividade está definida e deve ser controlada segundo o método referido na Parte 4 do presente Anexo.

3.4. Solução recém-preparada com cerca de 0,02 % (p/v) de pepsina em ácido clorídrico (3.2.); actividade: 400 U/1.

3.5. Emulsão de anti-espuma (silicone por exemplo)

3.6. Todos os reagentes indicados ao ponto 3 do método de doseamento das proteínas brutas

#### 4. Instrumentos

4.1. Banho-maria ou estufa incubadora regulada a 40 ° C  $\pm$  1 ° C.

4.2. Aparalhos de mineralização e destilação segundo Kjeldahl.

#### 5. Modo operativo

5.1. Obtenção da solução (ver observação 7.2.)

Introduzir 2 g de amostra pesada com a aproximação de 1 mg balão aferido de 500 ml e adicionar 450 ml de solução clorídrica de pepsina (3.4.) previamente elevada a 40 ° C. Agitar de forma a evitar a formação de aglomerados. Verificar que o pH da suspensão é inferior a 1,7. Colocar o balão no banho-maria ou na estufa incubadora (4.1.), durante 48 horas. Agitar decorridas 8, 24 e 32 h. Após 48 h, adicionar 15 ml de ácido clorídrico (3.1.), arrefecer a 20 ° C, completar até 500 ml com água e filtrar.

## 5.2. Mineralização

Recolher 250 ml do filtrado e introduzi-los no balão do destilador (4.2.). Juntar os reagentes necessários à mineralização, como indicado no método de doseamento das proteínas brutas, no ponto (5.1.), 2ª frase.

Homogeneizar e aquecer até à ebulição. Se houver formação de espuma, juntar algumas gotas de emulsão anti-espuma (3.5.). Manter uma ebulição viva até à evaporação quase completa da água. Eliminar com precaução os últimos vestígios de água, reduzindo a intensidade do aquecimento. Quando a solução aparecer límpida e incolor (verde claro em presença do catalisador à base de cobre), prosseguir a ebulição durante mais 1 hora. Em seguida, deixar arrefecer.

## 5.3. Destilação e titulação

Proceder como indicado no método de doseamento de proteínas brutas, pontos (5.2.) e (5.3.).

## 5.4. Ensaio em branco

Efectuar um ensaio em branco, aplicando o modo operativo na ausência da amostra para analisar.

## 6. Cálculo dos resultados

Deduzir o volume do ácido sulfúrico consumido no ensaio em branco do que foi gasto pela amostra. 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N corresponde a 1,4 mg de azoto.

Multiplicar a quantidade do azoto pelo factor 6,25. Expressar o resultado em percentagem de amostra.

## Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar:

- 0,4 em valor absoluto, para os teores inferiores a 20 %;
- 2,0 % em valor relativo, para os teores compreendidos entre 20 e 40 %;
- 0,8 em valor absoluto, para os teores superiores a 40 %.

## 7. Observações

7.1. Os valores obtidos pelo presente método não têm ligação directa com a digestibilidade «in vivo».

7.2. Aos produtos cujo teor de matérias gordas ultrapasse 10 % deve ser extraída previamente a gordura com éter de petróleo (eb. 40-60 ° C).

## 4. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA PEPSINA

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite controlar a actividade da pepsina utilizada para o doseamento de proteínas brutas solubilizadas pela pepsina e pelo ácido clorídrico.

### 2. Princípio

A hemoglobina é tratada, em condições definidas, pela pepsina em meio clorídrico. A fracção não hidrolizada das proteínas é precipitada pelo ácido tricloroacético. Ao filtrado é adicionado hidróxido de sódio e do reagente de Folin-Ciocalteu. A densidade óptica desta solução é medida a 750 nm e a quantidade de tirosina que lhe corresponde é lida numa curva-padrão.

Definição: A unidade de pepsina é definida como a quantidade desta enzima que liberta, por minuto, nas condições do método, uma quantidade de grupos hidroxiaril cuja coloração pelo reagente de Folin-Ciocalteu tem uma densidade óptica correspondente à de uma mole de tirosina, nas mesmas condições.

### 3. Reagentes

3.1. Ácido clorídrico 0,2 N.

3.2. Ácido clorídrico 0,06 N.

3.3. Ácido clorídrico 0,025 N.

3.4. Solução a 5 % (p/v) de ácido tricloroacético

3.5. Solução de hidróxido de sódio 0,5 N



3.6. Reagente de Folin-Ciocalteu. Introduzir 100 g de tungstato de sódio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g de molibdato de sódio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 700 ml de água balão de fundo redondo de 2 l de colo esmerilado normalizado. Juntar 50 ml de ácido fosfórico (d: 1,71) e 100 ml de ácido clorídrico concentrado (d: 1,19), ajustar ao balão um refrigerador de refluxo, aquecer até à ebulição e manter a solução em ebulição suave durante 10 h. Deixar arrefecer, desligar o refrigerador de refluxo. Adicionar 175 g de sulfato de lítio ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 50 ml de água e 1 ml de bromo. Ferver durante 15 minutos para eliminar o excesso de bromo.

Deixar arrefecer, transvasar a solução num balão aferido de 1 litro, completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Não poderá subsistir qualquer coloração esverdeada. Antes de utilizar, diluir um volume de reagente com dois volumes de água.

3.7. Solução de hemoglobina: Pesar uma quantidade de hemoglobina, substrato proteico de Anson (cerca de 2 g) correspondente a 354 mg de azoto (1) e introduzir num balão de 200 ml de colo esmerilado normalizado. Juntar alguns ml de ácido clorídrico (3.2.), ligar o balão à bomba de vácuo e agitar até à dissolução completa da hemoglobina. Desligar o vácuo e adicionar, agitando sempre, o ácido clorídrico (3.2.) para completar a 100 ml. Preparar imediatamente antes de utilizar.

3.8. Solução-padrão de tirosina: dissolver 181,2 mg de tirosina em ácido clorídrico (3.1.) e completar para 1 litro com o mesmo ácido (solução-mãe). Recolher 20,0 ml e diluir para 100 ml pelo ácido clorídrico (3.1.). 1 ml desta solução contém 0,2 mole de tirosina.

#### 4. Instrumentos

4.1. Banho-maria, regulado a  $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$  por ultratermostato.

4.2. Espectrofotómetro.

4.3. Cronómetro, precisão: 1 segundo.

4.4. Aparelho medidor de pH.

#### 5. Modo operativo

5.1. Preparação da solução (v. observação 7.1)

Dissolver 150 mg de pepsina em 100 ml de ácido clorídrico (3.2.). Recolher com uma pipeta 2 ml da solução, introduzi-los num balão aferido de 50 ml e completar o volume com ácido clorídrico (3.3.). O pH, verificado no aparelho medidor de pH, deve ser de  $1,6 \pm 0,1$ . Mergulhar o balão no banho-maria (4.1.).

#### 5.2. Hidrólise

Introduzir com a pipeta num tubo de ensaio 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7.), elevar a temperatura a  $25^\circ\text{C}$  em banho-maria (4.1.), adicionar 1,0 ml da solução de pepsina obtida em (5.1.) e misturar, com uma haste de vidro engrossada numa extremidade, com cerca de 10 movimentos de vaivém. Manter o tubo de ensaio no banho a  $25^\circ\text{C}$  durante 10 minutos, contados exactamente a partir da adição da solução de pepsina (a duração e a temperatura devem ser rigorosamente respeitadas). Em seguida, juntar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4.) a  $25^\circ\text{C}$ , homogeneizar e filtrar num filtro seco.

#### 5.3. Desenvolvimento da coloração e medida da densidade óptica

Recolher com uma pipeta 5,0 ml do filtrado, introduzi-los num erlenmeyer de 50 ml, adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5.) e, agitando sempre, 3,0 ml do reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6.). Após 5 a 10 minutos, determinar a densidade óptica da solução em espectrofotómetro, a 750 nm em «cuvettes» de 1 cm de espessura, por comparação com a água.

#### 5.4. Ensaio em branco

Para cada determinação, proceder a um ensaio em branco como se segue: Introduzir num tubo de ensaio com uma pipeta 5,0 ml de solução de hemoglobina (3.7.), elevar a temperatura a  $25^\circ\text{C}$  num banho-maria (4.1.), adicionar 10,0 ml de solução de ácido tricloroacético (3.4.) a  $25^\circ\text{C}$ , homogeneizar e adicionar em seguida, 1,0 ml da solução de pepsina obtida em (5.1.). Misturar com uma vareta de vidro e manter o tubo de ensaio exactamente 10 minutos no banho-maria (4.1.) a  $25^\circ\text{C}$ . Homogeneizar e filtrar num filtro seco. Prosseguir como indicado em (5.3.).

#### 5.5. Curva-padrão

Introduzir em erlenmeyer de 50 ml volumes de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml de solução-padrão de tirosina (3.8.), correspondente, respectivamente, a quantidades de tirosina de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 moles. Completar a série por um testemunho sem tirosina. Completar os volumes para 5,0 ml com ácido clorídrico (3.1.). Adicionar 10,0 ml de solução de hidróxido de sódio (3.5.) e, agitando sempre 3,0 ml de reagente diluído de Folin-Ciocalteu (3.6.). Medir a densidade óptica como indicado em (5.3.), na última frase. Traçar a curva-padrão, correlacionando as densidades ópticas com as quantidades de tirosina.

## 6. Cálculo dos resultados

Ler na curva-padrão a quantidade de tirosina, em mole, correspondente à densidade óptica da solução corada, diminuída dos valores do ensaio em branco.

A actividade da pepsina, em mole de tirosina por mg e por minuto, a 25 ° C, é dada pela fórmula:

Unidades por mg (V/mg) =

em que:

a - quantidade de tirosina, em  $\mu$ mole, lida na curva-padrão

p - peso em mg da quantidade de pepsina adicionada em 5.2.

## 7. Observações

7.1. A quantidade de pepsina a pôr em solução deve ser escolhida de maneira a obter, na medição fotométrica final, uma densidade óptica de  $0,35 \pm 0,035$ .

7.2. Duas unidades por mg obtidas pelo presente método correspondem a: 3,64 miliunidades Anson/mg ( $\mu$ mole de tirosina/mg min a 35,5 ° C) ou 36.400 unidades comerciais/g ( $\mu$ mole de tirosina/g em 10 min a 35,5 ° C).

## 5. DOSEAMENTO DO GOSSIPOL LIVRE E TOTAL

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear o gossipol livre, o gossipol total e as substâncias quimicamente aparentadas, nas sementes, farinhas e bagaços de algodão, assim como nos alimentos compostos que os contêm. O limite inferior do doseamento é de 20 ppm.

### 2. Princípio

O gossipol é extraído em presença de 3-amino-1-propanol, quer por uma mistura de isopropanol e de hexano para o doseamento do gossipol livre, quer pela dimetilformamida, para o doseamento do gossipol livre, quer pela dimetilformamida, para o doseamento do gossipol total. O gossipol é transformado por meio de anilina em gossipol-dianilina, cuja densidade óptica é medida em 440 nm.

### 3. Reagentes

3.1. Mistura de isopropanol-hexano: misturar 60 partes de isopropanol p.a. com 40 partes de volume de hexano normal, volume por volume.

3.2. Solvente A: Deitar num balão aferido de 1 l, cerca de 500 ml da mistura de isopropanol-hexano (3.1.), 2 ml de 3-amino-1-propanol, 8 ml de ácido acético glacial e 50 ml de água. Completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Este reagente é estável durante uma semana.

3.3. Solvente B: Deitar, com uma pipeta, num balão aferido de 100 ml, 2 ml de 3-amino-1-propanol e 10 ml de ácido acético glacial. Deixar arrefecer até à temperatura ambiente e completar o volume com N,N-dimetilformamida. Este reagente é estável durante uma semana.

3.4. Anilina p.a.: se a densidade óptica do ensaio em branco exceder 0,022, destilar a anilina em pó de zinco, eliminando as primeiras e últimas fracções de 10 % do líquido destilado. Em frasco bem rolhado de vidro escuro e no frigorífico este reagente conserva-se vários meses.

3.5. Solução-padrão A de gossipol: Deitar, num balão aferido de 250 ml, 27,9 mg de acetato de gossipol. Dissolver e completar o volume com o solvente A (3.2). Introduzir com uma pipeta 50 ml desta solução num balão aferido de 250 ml e completar o volume com o solvente A. A concentração em gossipol desta solução é de 0,02 mg/ml. Deixar repousar durante 1 hora à temperatura ambiente, antes de utilizar.

3.6. Solução-padrão B de gossipol: Deitar, num balão aferido de 50 ml, 27,9 mg de acetato de gossipol. Dissolver e completar o volume com o solvente B (3.3.). A concentração em gossipol desta solução é de 0,5 mg/ml.

Conservados ao abrigo da luz, as soluções padrão A e B de gossipol são estáveis durante 24 horas.

### 4. Instrumentos

4.1. Misturador basculante: cerca de 35 rotações por minuto

## 4.2. Espectrofotómetro.

### 5. Modo operativo

#### 5.1. Toma de ensaio

A toma de ensaio está relacionada com o que se calcula ser o teor de gossipol da amostra total. É preferível trabalhar com uma pequena toma de ensaio e com uma alíquota do filtrado relativamente importante, de maneira a obter uma quantidade de gossipol suficiente para efectuar uma medida fotométrica precisa. Para o doseamento do gossipol livre nas sementes, nas farinhas e nos bagaços de algodão, a toma de ensaio não deve exceder 1 g; para os alimentos compostos poderá atingir 5 g. Na maioria dos casos, uma alíquota de 10 ml do filtrado é conveniente: deverá conter 50 a 100 mg de gossipol. Para o doseamento de gossipol total, a toma de ensaio poderá variar de 0,5 a 5 g para que uma alíquota de 2 ml do filtrado contenha 40 a 200 µg de gossipol.

A análise deve ser feita a uma temperatura ambiente próxima de 20 ° C.

#### 5.2. Doseamento do gossipol livre

Introduzir a toma de ensaio num balão de colo esmerilado de 250 ml, com o fundo coberto de vidro moído. Adicionar com uma pipeta 50 ml de solvente A (3.2.), rolar o balão e misturar durante uma hora no misturador-basculante. Filtrar num filtro seco e recolher o filtrado num pequeno balão de colo esmerilado. Durante a filtração, cobrir o funil com um vidro de relógio. Introduzir com uma pipeta em dois balões aferidos de 25 ml (A e B) alíquotas idênticas de filtrado contendo 50 a 100 µg de gossipol. Completar eventualmente o volume para 10 ml com o solvente A (3.2.). Completar em seguida para 25 ml o conteúdo do balão (A) com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Esta solução será utilizada como solução de referência para a medição da solução da amostra.

Introduzir com uma pipeta 10 ml do solvente A (3.2.) respectivamente em dois outros balões aferidos de 25 ml (C e D). Completar o conteúdo do balão (C) com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Esta solução do ensaio em branco.

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.) em cada um dos balões (D) e (B). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante uma hora.

Determinar em espectrofotómetro a 440 nm, em cuvetes de vidro de 1 cm, a densidade óptica da solução do ensaio em branco (D), por comparação com a solução de referência (C) e a densidade óptica da solução da amostra (B) por comparação com a solução de referência (A).

Subtrair a densidade óptica da solução do ensaio em branco da densidade óptica da solução da amostra (= densidade óptica corrigida). Calcular, a partir deste valor, o teor de gossipol livre, com indicado em 6.

#### 5.3. Doseamento do gossipol total

Introduzir uma amostra contendo de 1 a 5 mg de gossipol num balão aferido de 50 ml e adicionar 10 ml de solvente B (3.3.). Preparar simultaneamente um ensaio em branco, introduzindo 10 ml de solvente B (3.3.) noutro balão aferido de 50 ml. Aquecer os dois balões durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arrefecer até à temperatura ambiente e completar o conteúdo de cada balão até ao volume de aferição com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Homogeneizar e deixar depositar durante 10 a 15 minutos, filtrar em seguida e recolher os filtrados em balões de colo esmerilado.

Deitar com uma pipeta 2 ml do filtrado da amostra em cada um de dois outros balões aferidos de 25 ml e 2 ml do filtrado do ensaio em branco em cada um de dois outros balões de 25 ml. Retirar um balão de cada série e completar os conteúdos respectivos para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.). Estas soluções serão utilizadas como soluções de referência.

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.), respectivamente, a cada um dos dois outros balões. Aquecer durante 30 minutos num banho de água a ferver para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar para 25 ml com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante uma hora.

Determinar a densidade óptica, como indicado em (5.2) para o gossipol livre. Calcular, a partir deste valor, o teor do gossipol total, como indicado em 6.

### 6. Cálculo dos resultados

O cálculo dos resultados pode fazer-se, quer a partir da densidade óptica específica (6.1.), quer por referência a uma curva-padrão (6.2.).

#### 6.1. A partir da densidade óptica específica.

Nas condições descritas, as densidades ópticas específicas são as seguintes:

gossipol livre:  $E_{1cm1\%} = 625$

gossipol total:  $E_{1cm1\%} = 600$

O teor de gossipol livre ou total da amostra é dado pela seguinte fórmula:

$\text{gossipol } \% = )$

em que:

E = densidade óptica corrigida, determinada como indicado em (5.2.)

p = amostra em g,

a = alíquota do filtrado em ml.

#### 6.2. A partir de uma curva-padrão

##### 6.2.1. Gossipol livre

Preparar duas séries de 5 balões aferidos de 25 ml. Em cada série, introduzir com uma pipeta nos balões, respectivamente, 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 e 10,0 ml da solução-padrão A de gossipol (3.5). Completar os volumes para 10 ml com solvente A (3.2.) Completar cada série com um testemunho constituído por um balão aferido de 25 ml contendo unicamente 10 ml de solvente A (3.2.).

Completar para 25 ml o volume dos balões da primeira série (incluindo o testemunho) com a mistura isopropanol-hexano (3.1.) (série de referência).

Juntar 2 ml de anilina (3.4.) em cada balão da segunda série (incluindo o testemunho). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição para fazer desenvolver a coloração. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante 1 hora (série-padrão).

Determinar, nas condições indicadas em (5.2.), a densidade óptica das soluções da série-padrão, por comparação com as soluções correspondentes da série de referência. Traçar graficamente a solução-padrão, inscrevendo as densidades ópticas em correlação com as quantidades de gossipol (em µg).

##### 6.2.2. Gossipol total

Preparar 6 balões aferidos de 50 ml. Introduzir no primeiro balão 10 ml de solvente B (3.3.) e nos outros, respectivamente, 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 e 10,0 ml da solução-padrão B de gossipol (3.6.). Completar o conteúdo de cada balão para 10 ml com solvente B (3.3.). Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.) e homogeneizar.

Introduzir 2, 0 ml destas soluções, respectivamente, em duas séries de 6 balões aferidos de 25 ml. Completar para 25 ml o conteúdo dos balões da primeira série com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.) (série de referência).

Adicionar 2 ml de anilina (3.4.) a cada balão da 2a série. Aquecer durante 30 minutos num banho-maria em ebulição. Arrefecer até à temperatura ambiente, completar o volume com a mistura de isopropanol-hexano (3.1.), homogeneizar e deixar repousar durante 1 hora (série-padrão).

Determinar nas condições indicadas em (5.2.), a densidade óptica das soluções da série-padrão, por comparação com as soluções correspondentes da série de referência. Traçar graficamente a curva-padrão, inscrevendo as densidades ópticas em correlação com as quantidades de gossipol (em µg).

#### 6.3. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas na mesma amostra, não deve ultrapassar:

- 15 %, em valor relativo, para os teores de gossipol inferiores a 500 ppm,
- 75 ppm, em valor absoluto, para os teores compreendidos entre 500 e 750 ppm,
- 10 %, em valor relativo, para os teores superiores a 750 ppm.

(1) Determinar o teor de azoto por um semi-microkjeldahl (concentração teórica: 17,7 % de azoto).

## ANEXO II

### 1. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DO GRUPO DAS TETRACICLINAS

### 1. Objecto e domínio e aplicação

Este método permite revelar e identificar os antibióticos do grupo das tetraciclina nos alimentos que contenham pelo menos em 0,1 ppm destes, nos concentrados e nas pré-misturas.

### 2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico. O extracto é cromatografado em papel, por via ascendente, em comparação com as soluções de referência. Os antibióticos são revelados e identificados por comparação dos seus valores  $R_f$ , com os das substâncias-padrão, quer por fluorescência aos UV (fortes concentrações de antibióticos), quer por bioautografia em meio de ágar-ágar, inoculado com *B. cereus*.

### 3. Reagentes e meio de cultura

#### 3.1. Tampão, pH 3,5

Ácido cítrico monohidratado p.a. 10,256 g

Fosfato dissódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  p.a. 7,45 g

Acetona p.a. 300 ml

Água destilada para 1 000 ml

#### 3.2. Tampão de fosfato, pH 5,5

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 130,86 g

Fosfato dissódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  p.a. 6,947 g

Água destilada para 1 000 ml

#### 3.3. Eluente I: Mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/a-dicloridrina: 20/10/1,5 em volume.

Preparar no momento da utilização.

#### 3.4. Eluente II: mistura de nitrometano puro/clorofórmio puro/a-picolino: 20/10/3 em volume. Preparar no momento da utilização.

#### 3.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

#### 3.6. Ácido clorídrico 0,1 N.

#### 3.7. Amoníaco, d: 0,91.

#### 3.8. Substâncias-padrão: clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina cuja actividade é expressa em cloridrato.

#### 3.9. Microorganismo: *B. cereus* ATCC no 11.778

Conservação da estirpe, preparação da suspensão de esporos e inoculação do meio de cultura: aplicar as prescrições 3.1 e 3.2 do método de doseamento da clorotetraciclina, da oxitetraciclina e da tetraciclina por difusão em ágar-ágar, constantes da Parte 2 do presente anexo.

#### 3.10. Meio de cultura (1)

Glicosa 1 g

Peptona tríptica 10 g

Extracto de carne 1,5 g

Extracto de levadura 3 g

Ágar-ágar 20 g

Água destilada para 1 000 ml

Ajustar o pH a 5,8 no momento da utilização.

#### 3.11. Solução a 0,1 % (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e 5 % (p/v) de glicose.

### 4. Instrumentos

#### 4.1. Aparelhagem de cromatografia ascendente em papel (altura do papel: 25 cm). Papel Schleicher e Schuell 2040 b ou 2043 b, ou equivalente.

#### 4.2. Centrífugadora.

#### 4.3. Estufa de incubadora, regulada a 30 ° C.

#### 4.4. Lâmpada UV para detecção da fluorescência.

#### 4.5. Placas de vidro de cerca de 20 × 30 cm, permitindo a montagem de uma caixa achatada para a bioautografia.

### 5. Soluções-padrão

#### 5.1. Soluções-mae

Preparar, a partir das substâncias-padrão (3.8.) com ácido clorídrico (3.6.), soluções cuja concentração corresponda, respectivamente, a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml e de tetraciclina-HCl por ml.

## 5.2. Soluções de referência para a detecção aos UV

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentração corresponda a 100 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

## 5.3. Soluções de referência para a detecção por bioautografia

Diluir as soluções (5.1.) com tampão fosfato (3.2.) para obter soluções cuja concentração corresponda a 5 µg de clorotetraciclina-HCl, de oxitetraciclina-HCl e de tetraciclina-HCl por ml.

## 6. Extração

Sempre que se espera uma concentração de antibiótico inferior a 10 ppm, pode utilizar-se quer a amostra homogeneizada, quer a fracção mais fina separada através de uma peneira, dado que os antibióticos se encontram preferencialmente nesta fracção.

Ressuspender a amostra na mistura (3.5.) e centrifugar. Recolher o sobrenadante para utilizar tal como esteja, ou diluí-lo, se necessário com a mistura (3.5.), para obter concentrações de antibiótico de cerca de 100 µg (6.1.) e 5 µg (6.2.) por ml.

## 7. Detecção e identificação

### 7.1. Cromatografia

Mergulhar o papel na solução tampão pH 3,5 (3.1.). Eliminar o excesso de líquido comprimindo o papel entre folhas de papel de filtro seco. Em seguida, depositar no papel, volumes de 0,01 ml das soluções de referência (5.2. e 5.3.) e do extracto (6.1. e 6.2.). Para obter uma boa separação é muito importante, o teor apropriado de humidade do papel; deixar secar ligeiramente, se necessário.

Revelar por cromatografia ascendente. Utilizar o eluente I (3.3.) para a detecção por bioautografia, o eluente II (3.4.) para a detecção aos UV. Logo que a linha de frente do solvente atingir 15 a 20 cm de altura (cerca de 1 h 30 m), interromper a cromatografia e secar o papel.

### 7.2. Detecção aos UV

Logo que a concentração de antibiótico seja superior a 1 µg/cm<sup>2</sup>, observam-se manchas fluorescentes douradas por irradiação com UV (4.4.), após tratamento do cromatograma por vapores amoniacais (3.7.).

### 7.3. Detecção por bioautografia

Deitar o meio de cultura (3.10.), previamente inoculado com *B. cereus* (3.9.), sobre placas de vidro (4.5.) e colocar o papel sobre o meio de cultura. Depois de 5 minutos de contacto, tirar o papel e colocá-lo sobre um outro ponto do meio de cultura, onde deve ser mantido durante o período de incubação. Incubar em seguida, durante uma noite, na estufa a 30 ° C. A presença de um antibiótico do grupo das tetraciclinas reconhece-se por zonas de inibição claras no meio de cultura turvo.

Para fixar o cromatograma, vaporiza-se a solução (3.11.) sobre o papel, depois da incubação.

### 7.4. Identificação

Dão-se a seguir os valores R<sub>f</sub> relativos dos antibióticos do grupo das tetraciclinas. Estes valores podem variar ligeiramente, conforme a qualidade do papel e o seu teor de humidade.

Clorotetraciclina (CTC) 0,60

Tetraciclina (TC) 0,40

Oxitetraciclina (OTC) 0,20

4-epi-CTC 0,15

4-epi-TC 0,13

4-epi-OTC 0,10

Os compostos «epi» têm uma actividade antibiótica inferior à dos compostos normais.

## 2. DOSEAMENTO DA CLOROTETRACICLINA, DA OXITETRACICLINA E DA TETRACICLINA

### A. POR DIFUSÃO EM ÁGAR-ÁGAR

#### 1. Objecto e domínio da aplicação

Este método permite dosear a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) nos alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 5 ppm. Os teores inferiores a 5 ppm podem ser estimados por extrapolação gráfica.

#### 2. Princípio

Para os teores iguais ou inferiores a 50 ppm, a amostra é submetida a extracção pela formamida diluída. Para os teores superiores a 50 ppm, procede-se à extracção por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento da CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento da OTC e da TC.

Os extractos são em seguida diluídos e a sua actividade antibiótica é determinada pela medição da difusão da CTC, da OTC ou da TC, em meio de ágar-ágar, inoculado com *B. cereus*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença de um microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

### 3. Microrganismo: *B. cereus* ATCC no 11.778

#### 3.1. Conservação da estirpe

Inocular *B. cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) sem azul de metileno nem ácido bórico. Incubar durante uma noite a cerca de 30 ° C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar, de 14 em 14 dias para ágar-ágar inclinado.

#### 3.2. Preparação da suspensão de esporos

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.5.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.), sem azul de metileno nem ácido bórico, com uma concentração de ágar-ágar de 3 a 4 %. Incubar 3 a 5 dias a 28-30 ° C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.6.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio, e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base do doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de antibiótico utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límpidas. Esta quantidade é geralmente de 0,2 a 0,3 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se entre 50 e 60 ° C.

### 4. Meios de cultura e reagentes

#### 4.1. Meio de base do doseamento (2)

Glicose 1 g

Peptona tríptica 10 g

Extracto de carne 1,5 g

Extracto de levadura 3 g

Ágar-ágar, segundo a quantidade 10 a 20 g

Tween 80 1 ml

Tampão fosfato, pH 5,5 (4.2) 10 ml

Solução de ácido bórico a 5 % (p/v) 15 ml

Solução etanólica de azul de metileno a 5 % 4 ml

Água destilada para 1 000 ml

Ajustar a pH 5,8 antes da utilização

#### 4.2. Tampão fosfato, pH 5,5

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 130,86 g

Fosfato disódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  p.a. 6,947 g

Água destilada para 1 000 ml

#### 4.3. Tampão fosfato, pH 5,5 diluído a 1/10.

#### 4.4. Tampão fosfato, pH 8

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 1,407 g

Fosfato dissódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  p.a. 57,539 g

Água destilada para 1 000 ml

#### 4.5. Soro fisiológico esterilizado

#### 4.6. Etanol a 20 % (v/v).

#### 4.7. Ácido clorídrico 0,1 N.

#### 4.8. Formamida a 70 % (v/v): preparar, de fresco, antes de utilizar e ajustar o pH 4,5 com ácido sulfúrico 2 N, aproximadamente.

#### 4.9. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d: 1,19): 65/33/2, em volume.

#### 4.10. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

#### 4.11. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC cuja actividade é expressa em cloridrato.

## 5. Soluções-padrão

### 5.1. Clorotetraciclina

Preparar, a partir da substância-padrão (4.11.) com ácido clorídrico (4.7.) uma solução-mae cuja concentração corresponda a 500 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

A partir desta solução-mae, preparar uma solução-padrão de trabalho S8 cuja concentração corresponda a 0,2 µg de clorotetraciclina-HCl por ml. A diluição é feita com tampão fosfato, pH 5,5, diluído 1/10 (4.3.), com 0,01 % de negro de amido (3).

Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão (4.3.), as seguintes concentrações:

S4 0,1 µg/ml

S2 0,05 µg/ml

S1 0,025 µg/ml

### 5.2. Oxitetraciclina

Procedendo como indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mae cuja concentração corresponda a 400 µg de oxitetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S8 a 1,6 µg de oxitetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S4 0,8 µg/ml

S2 0,4 µg/ml

S1 0,2 µg/ml

### 5.3. Tetraciclina

Procedendo como indicado em (5.1.), preparar, a partir de uma solução-mae cuja concentração corresponda a 500 µg de tetraciclina-HCl por ml, uma solução-padrão de trabalho S8 a 1,0 µg de tetraciclina-HCl por ml e as seguintes concentrações:

S4 0,5 µg/ml

S2 0,25 µg/ml

S1 0,125 µg/ml

## 6. Extracção

### 6.1. Teores iguais ou inferiores a 50 ppm

Tratar a amostra pela formamida (4.8.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido. Agitar durante 30 minutos numa mesa vibratória. Diluir imediatamente a seguir com tampão fosfato (4.3.), segundo as indicações dadas no quadro abaixo inserido, para se obter a concentração U8. A concentração de formamida desta solução não deve ultrapassar 40 %. Centrifugar ou deixar decantar de forma a obter uma solução límpida.

Preparar em seguida as concentrações U4, U2 e U1, por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

"" ID="1">Concentração esperada em ppm> ID="2">10> ID="3">50> ID="4">10> ID="5">50>  
ID="6">10> ID="7">50> ID="1">Amostra em g> ID="2">10> ID="3">10> ID="4">24>  
ID="5">9,6> ID="6">20> ID="7">10> ID="1">ml de formamida (4.8.)> ID="2">100> ID="3">100>  
ID="4">80> ID="5">100> ID="6">80> ID="7">100> ID="1">ml de tampão fosfato (4.3.)>  
ID="2">dil. 1: 5 (1)> ID="3">dil. 1: 25 (2)> ID="4">70> ID="5">200> ID="6">120> ID="7">dil. 1: 5  
(1)> ID="1">Concentração U8 em µg/ml> ID="2">0,2> ID="3">0,2> ID="4">1,6> ID="5">1,6>  
ID="6">1,0> ID="7">1,0>

### 6.2. Teores superiores a 50 ppm

#### 6.2.1. Clorotetraciclina

Tratar, segundo a concentração esperada de antibiótico da amostra total ou a sua garantia de fabrico, uma toma de ensaio de 2 a 10 g por 20 vezes o seu volume de mistura (4.9.). Agitar durante 30 minutos em mesa vibratória. Verificar que o pH se mantém inferior a 3 no decorrer da extracção; se for necessário, ajustar a pH 3 (para os compostos minerais, com ácido acético a 10 %). Recolher uma alíquota do extracto e ajustar o pH a 5,5, com tampão fosfato, pH 8 (4.4.) em presença de verde de bromocresol (passagem do amarelo a azul). Diluir com o tampão fosfato, pH 5,5 diluído 1/10 (4.3.) para obter a concentração U6 (ver 6.1.).



Preparar, em seguida, as concentrações U4, U2 e U1 por diluições sucessivas (1 + 1) com tampão fosfato (4.3.).

#### 6.2.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Proceder como indicado em (6.2.1.), substituindo mistura (4.9.) pela mistura (4.10.).

### 7. Método de doseamento

#### 7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 50-60 ° C o meio de base do doseamento (4.1.) com a suspensão de esporos (3.2.).

#### 7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S8, S4, S2, S1) e as 4 concentrações do extracto (U8, U4, U2, U1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade de meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura, aproximadamente. É preferível utilizar placas de vidro munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica completamente liso de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com a pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

#### 7.3. Incubação

Incubar as placas durante cerca de 18 horas a 28-30 ° C.

### 8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas representativas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências, as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa

### 9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

### B. POR TURBIDIMETRIA

#### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear a clorotetraciclina (CTC), a oxitetraciclina (OTC) e a tetraciclina (TC) em concentrações superiores a 1 g/kg desde que nenhuma outra substância interfira dando lugar a extractos túrbidos. Este método é mais rápido do que o método de difusão em ágar-ágar.

#### 2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma mistura de acetona, água e ácido clorídrico para o doseamento de CTC, e por uma mistura de metanol e de ácido clorídrico para o doseamento de OTC e TC.

Os extractos são em seguida diluídos e o seu efeito antibiótico é determinado pela medição da transmissão luminosa de um meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus*, com adição do antibiótico. A transmissão luminosa é função da concentração do antibiótico.

#### 3. Microrganismo: *Staphylococcus aureus* K 141 (4)

##### 3.1. Conservação da estirpe

Inocular *S. aureus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.), com adição de 1,5 a 3 % de ágar-ágar (conforme a qualidade). Incubar durante uma noite a 37 ° C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas para ágar-ágar inclinado. Preparar simultaneamente subculturas para uso de laboratório.

##### 3.2. Preparação do inóculo

Repicar 24 horas antes da sua utilização, uma subcultura para ágar-ágar inclinada e incubar durante uma noite a 37 ° C. Ressuspender a totalidade da cultura de um tubo de ágar-ágar em cerca de 2 ml do meio de base (4.1.) e transvasar em seguida a suspensão em condições de esterilidade em cerca de 100 ml, aproximadamente, do mesmo meio de base (4.1.). Incubar em banho-maria a 37 ° C, até que o crescimento da estirpe entre na fase logarítmica (1 h 30 a 2 h).

#### 4. Meio de cultura e reagentes

##### 4.1. Meio de base do doseamento (5)

Peptona 5 g

Extracto de levedura 1,5 g

Extracto de carne 1,5 g

Cloreto de sódio 3,5 g

Glicose 1,0 g

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 1,32 g

Fosfato bipotássico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  p.a. 3,68 g

Água destilada para pH depois da esterilização: 6,8 a 7,0 1 000 ml

##### 4.2. Tampão fosfato, pH 4,5

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 13,6 g

Água destilada para 1 000 ml

##### 4.3. Ácido clorídrico 0,1 N.

4.4. Mistura de acetona pura/água/ácido clorídrico (d: 1,19): 65/33/2 em volume.

4.5. Mistura de metanol puro/ácido clorídrico (d: 1,19): 98/2 em volume.

4.6. Solução de formaldeído a, aproximadamente, 10 % (p/v).

4.7. Substâncias-padrão: CTC, OTC, TC, cuja actividade é expressa em cloridrato.

#### 5. Solução-padrão

Preparar, a partir da substância-padrão (4.7.) com ácido clorídrico (4.3.), uma solução-mãe cuja concentração corresponda a 400 a 500 µg de CTC-HCl, OTC-HCl ou TC-HCl por ml. Esta solução conserva-se uma semana no frigorífico.

#### 6. Extracção

##### 6.1. Clorotetraciclina

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar cerca de 100 ml da mistura (4.4.) e agitar durante 30 minutos sobre uma mesa vibratória. Completar o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

##### 6.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Introduzir num balão aferido de 200 ou 250 ml uma amostra de 1 a 2 g. Adicionar 100 ml, aproximadamente, da mistura (4.5.) e agitar durante 30 minutos sobre a mesa vibratória. Completar, o volume com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.). Homogeneizar e deixar depositar.

#### 7. Método de doseamento

##### 7.1. Preparação de séries-padrão e de extracto

Diluir de forma apropriada com tampão fosfato, pH 4,5 (4.2.) a solução-padrão (5.) e extracto (6.) de forma a obter uma série de concentrações que permita estabelecer, para cada doseamento, uma curva-padrão e a interpolação, nesta curva, de pelo menos dois valores relativos ao extracto. As diluições devem ser escolhidas em função das condições de crescimento da estirpe, que podem variar de um laboratório para outro. Proceder-se geralmente, como se segue:

##### 7.1.1. Clorotetraciclina

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução-padrão de trabalho cuja concentração corresponda a 0,2 mg

de CTC-HCl por ml. Preparar seguidamente com tampão fosfato (4.2) como indicado a seguir e em tubos destinados ao doseamento, 6 diluições, com uma repetição de cada diluição.

>mg> ID="1">0,7> ID="2">0,3> ID="3">0,14"> ID="1">0,6> ID="2">0,4> ID="3">0,12">  
ID="1">0,55> ID="2">0,45> ID="3">0,11"> ID="1">0,45> ID="2">0,55> ID="3">0,09">  
ID="1">0,4> ID="2">0,6> ID="3">0,08"> ID="1">0,3> ID="2">0,7> ID="3">0,06">

Diluir o extracto (6.1.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração esperada de CTC-HCl de 0,12 m g/l. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,75 ml (= 0,09 m g) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão fosfato (4.2.).

#### 7.1.2. Oxitetraciclina e tetraciclina

Diluir a solução-padrão (5.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma solução uma solução-padrão de trabalho cuja concentração corresponda a 0,6 m g de OTC-HCl ou de TC-HCl por ml. Preparar em seguida com tampão fosfato (4.2.), como indicado a seguir, e nos tubos destinados ao doseamento, 7 diluições com uma repetição de cada diluição.

>m"> ID="1">0,9> ID="2">0,1> ID="3">0,54"> ID="1">0,8> ID="2">0,2> ID="3">0,48">  
ID="1">0,7> ID="2">0,3> ID="3">0,42"> ID="1">0,6> ID="2">0,4> ID="3">0,36"> ID="1">0,4>  
ID="2">0,6> ID="3">0,24"> ID="1">0,3> ID="2">0,7> ID="3">0,18"> ID="1">0,2> ID="2">0,8>  
ID="3">0,12">

Diluir o extracto (6.2.) com tampão fosfato (4.2.) para obter uma concentração teórica de OTC-HCl ou TC-HCl de 0,48 m g/ml. Introduzir 1 ml desta solução em 2 tubos e 0,5 ml (= 0,24 m g) em outros 2 tubos. Completar o volume destes últimos para 1 ml com tampão de fosfato (4.2.).

#### 7.2. Inoculação do meio de cultura

Inocular o meio de base de doseamento (4.1.) com o inóculo (3.2.), de forma a obter no fotómetro em 590 nm, uma transmissão luminosa de 85 %, numa «cuvette» de 5 cm, ou 92 % numa «cuvette» de 2 cm, estando o aparelho regulado para 100 % de transmissão com o meio de base (4.1.) não inoculado.

#### 7.3. Inoculação

Introduzir em cada tubo (7.1.1. ou 7.1.2.) 9 ml do meio de cultura inoculado (7.2.). O enchimento dos tubos deve fazer-se correctamente, mas não necessariamente em condições de esterilidade.

#### 7.4. Incubação

A incubação deve fazer-se, obrigatoriamente, num banho-maria cuja temperatura seja mantida homogeneamente a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , por agitação. O tempo de incubação deve ser escolhido de forma a poder traçar curvas de transmissão, cuja inclinação seja adequada a medições rigorosas (geralmente 2 h 30 a 3 h). Bloquear em seguida o crescimento, injectando rapidamente 1 ml de solução de formaldeído (4.6.) em cada tubo.

#### 7.5. Medição do crescimento

Medir as transmissões no fotómetro a 590 nm, regulando o aparelho para 100 % de transmissão com a solução-padrão mais límpida (correspondente ao teor mais elevado de antibiótico). Em virtude das fracas diferenças de turbidez apresentadas por diferentes tubos, recomenda-se a utilização de cuvettes de 2 cm, pelo menos, e, de preferência, de 5 cm.

#### 8. Cálculo dos resultados

Traçar graficamente a curva-padrão em papel milimétrico, marcando as transmissões fotométricas em correlação com as concentrações de antibiótico. Interpoler na curva as transmissões relativas ao extracto. Calcular o teor de antibiótico da amostra.

#### 9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

#### 3. DOSEAMENTO DA OLEANDOMICINA

- por difusão em ágar-ágar -

##### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear a oleandomicina em alimentos, concentrados e pré-misturas, mesmo em presença de tetraciclina. O limite inferior do doseamento é de 0,5 ppm.

##### 2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma solução metanólica diluída de tris (hidroximetil) aminometano. Depois da centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da oleandomicina em meio de ágar-ágar inoculado com *B. cereus*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro destas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

##### 3. Microrganismo *B. cereus* K 205 TR (6) (resistente às tetraciclinas)

### 3.1. Conservação da estirpe

Inocular *B. cereus* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.) com adição de 100 mg de oxitetraciclina por 5 ml. Incubar durante uma noite a cerca de 30 ° C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 4 em 4 semanas em ágar-ágar inclinado.

### 3.2. Preparação da suspensão de esporos

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) com cerca de 3 ml de soro fisiológico (4.3.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 300 ml do meio de cultura (4.1.) cuja concentração de ágar-ágar seja de 3 a 4 %. Incubar 3 a 5 dias a 28-30 ° C, recolher em seguida os esporos em 15 ml de etanol (4.4.), depois de ter verificado a esporulação ao microscópio e homogeneizar. Esta suspensão pode ser conservada no frigorífico durante 5 meses, pelo menos.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.2.), determinar a quantidade de inóculo, que permite obter, para as diferentes concentrações de oleandomicina utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que sejam ainda límpidas. Esta quantidade é geralmente de 0,1 a 0,2 ml/1 000 ml. A inoculação do meio de cultura faz-se a 60 ° C.

## 4. Meios de cultura e reagentes

### 4.1. Meio de conservação da estirpe (7)

Glicose 1 g

Peptona trípica 10 g

Extracto de carne 1,5 g

Extracto de levedura 3 g

Ágar-ágar, conforme a qualidade 10 a 20 g

Água destilada para 1 000 ml

Ajustar o pH a 6,5 no momento da utilização.

### 4.2. Meio de base de doseamento (7)

Meio (4.1.) ajustado a pH 8,8

### 4.3. Soro fisiológico esterilizado

### 4.4. Etanol a 20 % (v/v)

### 4.5. Metanol puro

### 4.6. Solução de tris (hidroximetil) aminometano p.a. a 5 % (p/v)

### 4.7. Solução de extracção

Metanol puro 50 ml

Água destilada 50 ml

Tris (hidroximetil) aminometano p.a. 0,5 g

### 4.8. Substância-padrão: oleandomicina de actividade conhecida.

## 5. Solução-padrão

Dissolver a substância-padrão (4.8.) em 5 ml de metanol (4.5.) e diluir com a solução (4.6.) para se obter uma concentração em oleandomicina de 100 mg/ml.

A partir desta solução-mãe preparar, diluindo com a solução (4.6.), uma solução-padrão de trabalho S8 contendo 0,1 mg de oleandomicina por ml. Preparar em seguida, por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.), as seguintes soluções:

S4 0,05 mg/ml

S2 0,025 mg/ml

S1 0,0125 mg/ml

## 6. Extracção

Recolher, conforme a concentração esperada de oleandomicina da amostra, uma toma de ensaio de 2 a 10 g, adicionar 100 ml da solução (4.7.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória.

Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a solução (4.6.) para obter uma concentração teórica de oleandomicina de 0,1 mg/ml (= U8). Preparar em seguida as concentrações U4, U2 e U1 por diluições sucessivas (1 + 1) com a solução (4.6.).

## 7. Método de doseamento

### 7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 60 ° C o meio de base do doseamento (4.2.) com a suspensão de esporos (3.2.).

### 7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar é efectuada em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S8, S4, S2, S1) e as 4 concentrações do extracto (U8, U4, U2, U1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de forma a que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm, aproximadamente de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plano de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico, compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

### 7.3. Incubação

Incubar as caixas durante cerca de 18 h a 28-30 ° C.

### 8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição de preferência por projecção. Inscrever os valores de medições em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

### 9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

## 4. DOSEAMENTO DA TILOSINA

- por difusão em ágar-ágar -

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear a tilosina em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 2 ppm.

### 2. Princípio

A amostra é tratada por uma solução de tampão fosfato a pH 8, previamente aquecido a 80 ° C, e submetida em seguida a extracção pelo metanol. Após centrifugação, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da tilosina num meio de ágar-ágar, inoculado com a *Sarcina lutea*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro destas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

### 3. Microrganismo *Sarcina lutea* ATCC no 9341

#### 3.1. Conservação da estirpe

Inocular *Sarcina lutea* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.), com o pH ajustado a 7,0. Incubar durante uma noite a cerca de 35 ° C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar todos os meses para ágar-ágar inclinado.

#### 3.2. Preparação da suspensão de bactérias

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.) de preparação recente, com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.4.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura (4.1.), com o pH ajustado a 7,0. Incubar durante 24 horas a 35 ° C, recolher as bactérias com 25 ml de soro fisiológico (4.4.). Homogeneizar e diluir esta suspensão para obter uma transmissão luminosa de cerca de 75 % a 650 nm.

Conservada no frigorífico, esta suspensão é utilizável durante uma semana.

Por ensaios preliminares em placas com o meio de base de doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de tilosina utilizada, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límidas. A inoculação do meio de cultura é feita a 48 - 50 ° C.

### 4. Meios de cultura e reagentes

#### 4.1. Meio de base do doseamento (8)

Glicose 1 g

Peptona tríptica 10 g

Extracto de carne 1,5 g

Extracto de levedura 3 g

Ágar-ágar, conforme a qualidade 10 a 20 g

Água destilada para 1 000 ml

Ajustar no momento da utilização a pH 7,0 para a conservação da estirpe e a preparação da suspensão de bactérias e a pH 2,0 para o doseamento.

#### 4.2. Tampão fosfato pH 8

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,523 g

Fosfato bipotássico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  p.a. 16,730 g

Água destilada para 1 000 ml

#### 4.3. Tampão fosfato, pH 7

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 5,5 g

Fosfato bipotássico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  p.a. 13,6 g

Água destilada para 1 000 ml

#### 4.4. Soro fisiológico esterilizado

#### 4.5. Metanol puro

#### 4.6. Metanol a 10 % (v/v)

#### 4.7. Mistura tampão fosfato (4.2.) /metanol puro: 60/40, em volume.

#### 4.8. Substância-padrão: tilosina de actividade conhecida.

#### 5. Soluções padrão

Secar a substância-padrão (4.8.) durante 3 h a 60 ° C numa estufa de vácuo (5 mm de mercúrio). Pesar 10 a 50 mg num balão aferido, dissolvê-los em 5 ml de metanol (4.5.) e diluir a solução com o tampão fosfato, pH 7 (4.3.) para obter uma concentração de tilosina-base de 1 000 mg/ml.

A partir desta solução-mão, preparar, diluindo com a mistura (4.7.), uma solução-padrão de trabalho S8 contendo 2 mg de tilosina-base por ml.

Preparar em seguida, por meio de diluições sucessivas (1 + 1), com a mistura (4.7), as seguintes concentrações:

S4 1 mg/ml

S2 0,5 mg/ml

S1 0,25 mg/ml

#### 6. Extração

Recolher, para os concentrados, uma toma de ensaio de 10 g; para as prémisturas e alimentos, uma toma de ensaio de 20 g. Adicionar 60 ml de tampão fosfato, pH 8 (4.2.), previamente aquecido a 80 ° C, e homogeneizar durante 2 minutos (electrodoméstico, Ultra-turrax, etc.).

Em seguida, deixar repousar 10 minutos, adicionar 40 ml de metanol (4.5.) e homogeneizar durante 5 minutos. Centrifugar, recolher uma alíquota do extracto e diluir com a mistura (4.7.) para obter uma concentração teórica de tilosina de 2 mg/ml (= U8). Preparar em seguida as concentrações U4, U2 e U1, por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.7).

Para os teores inferiores a 10 ppm, fazer evaporar o extracto a seco num evaporador rotativo a 35 ° C e ressuspender o resíduo em metanol a 40 % (4.6).

#### 7. Método de doseamento

##### 7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 48 - 50 ° C o meio de base do doseamento (4.1.), ajustado a pH 8,0 pela suspensão de bactérias (3.2.).

##### 7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S8, S4, S2, S1) e as 4 concentrações do extracto (U8, U4, U2, U1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de tal forma que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos, 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade do meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 2 mm de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plana de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades, quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico compreendida entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer, pelo menos, quatro repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição.

### 7.3. Incubação

Incubar as placas durante uma noite a 35-37 ° C.

### 8. Avaliação

Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência, por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

Actividade real = actividade esperada × actividade relativa.

### 9. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

## 5. DOSEAMENTO DA VIRGINIAMICINA

- por difusão em ágar-ágar -

### 1. Objecto e domínio de aplicação

Este método permite dosear a virginiamicina em alimentos, concentrados e pré-misturas. O limite inferior do doseamento é de 2 ppm.

### 2. Princípio

A amostra é submetida a extracção por uma solução metanólica de Tween 80. Após centrifugação ou filtração, o extracto é diluído e a sua actividade antibiótica determinada pela medição da difusão da virginiamicina em meio de ágar-ágar inoculado com *Sarcina lutea*. A difusão é indicada pela formação de zonas de inibição em presença do microrganismo. O diâmetro dessas zonas é directamente proporcional ao logaritmo da concentração do antibiótico.

### 3. Microrganismo: *Sarcina lutea* ATCC no 9341

#### 3.1. Conservação da estirpe

Inocular *S. lutea* em ágar-ágar inclinado em tubo, constituído pelo meio de cultura (4.1.). Incubar durante uma noite a cerca de 35 ° C. Conservar a cultura no frigorífico e repicar de 14 em 14 dias em ágar-ágar inclinado.

#### 3.2. Preparação da suspensão de bactérias

Recolher as bactérias de um tubo de ágar-ágar inclinado (3.1.), de preparação recente, com 2 a 3 ml de soro fisiológico (4.3.). Inocular com esta suspensão um frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura (4.1.). Incubar durante 24 horas a 35 ° C, recolher as bactérias com 25 ml de soro fisiológico (4.3.). Homogeneizar e diluir esta suspensão para obter uma transmissão luminosa de cerca de 75 % a 650 nm. Conservada no frigorífico, esta suspensão pode ser utilizada durante uma semana.

Por ensaios preliminares em placas com meio de base do doseamento (4.1.), determinar a quantidade de inóculo que permite obter, para as diferentes concentrações de virginiamicina utilizadas, zonas de inibição tão extensas quanto possível e que estejam ainda límpidas. A inoculação do meio de cultura é feita a 48-50 ° C.

### 4. Meios de cultura e reagentes

#### 4.1. Meio de base do doseamento (9)

Glicose 1 g

Peptona trípica 10 g

Extracto de carne 1,5 g

Extracto de levadura 3 g

Ágar-ágar, conforme a qualidade 10 a 20 g

Água destilada para 1 000 ml

Ajustar o pH a 6,5 antes da utilização

4.2. Tampão de fosfato, pH 6

Fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  p.a. 8,0 g

Fosfato bipotássico  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  p.a. 2,0 g

Água destilada para 1 000 ml

4.3. Soro fisiológico esterilizado

4.4. Metanol puro

4.5. Mistura tampão fosfato (4.2.) /metanol puro: 80/20, em volume.

4.6. Solução metanólica de Tween 80 a 0,5 % (p/v).

4.7. Substância-padrão: virginiamicina de actividade conhecida.

5. Solução-padrão

Preparar uma solução metanólica de substância-padrão (4.7.) a 800 mg de virginiamicina por ml. A partir desta solução-mãe, preparar, diluindo com a mistura (4.5.) uma solução-padrão de trabalho S8, contendo 1 mg de virginiamicina por ml. Preparar em seguida, por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.5.), as seguintes concentrações:

S4 0,5 mg/ml

S2 0,25 mg/ml

S1 0,125 mg/ml

6. Extração

6.1. Produtos cujo teor em virginiamicina é igual ou inferior a 50 ppm

Recolher uma amostra de 10 a 20 g, adicionar 100 ml da solução (4.6.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória. Centrifugar ou filtrar, recolher 20 ml da solução límpida e evaporá-los a seco, num evaporador rotativo. Ressuspender o resíduo em 20 ml, ou mais da mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de virginiamicina de 1 mg/ml (= U8). Preparar em seguida as concentrações U4, U2 e U1 por meio de diluições sucessivas (1 + 1) com a mistura (4.5.).

6.2. Produtos com um teor de virginiamicina superior a 50 ppm

Recolher uma amostra de 1 a 10, adicionar 100 ml da solução (4.6.) e agitar durante 30 minutos na mesa vibratória. Centrifugar ou filtrar e diluir em seguida com a mistura (4.5.) para obter uma concentração teórica de virginiamicina de 1 mg/ml (= U8). Preparar em seguida as concentrações U4, U2 e U1, como indicado em (6.1.).

7. Método de doseamento

7.1. Inoculação do meio de cultura

Inocular a 48-50 ° C o meio de base do doseamento (4.1.) com a suspensão de bactérias (3.2).

7.2. Preparação das placas

A difusão em ágar-ágar efectua-se em placas com as 4 concentrações da solução-padrão (S8, S4, S2, S1) e as 4 concentrações do extracto (U8, U4, U2, U1). Cada placa deve receber necessariamente as 4 concentrações do padrão e do extracto.

Para este efeito, escolher as dimensões das placas de maneira a que se possam fazer, no meio de ágar-ágar, pelo menos 8 cavidades de 10 a 13 mm de diâmetro. Calcular a quantidade de meio de cultura inoculado (7.1.) a utilizar, de forma a obter uma camada uniforme de cerca de 20 mm de espessura. É preferível utilizar placas de Petri munidas de um anel de alumínio ou de matéria plástica perfeitamente plano, de 200 mm de diâmetro e 20 mm de altura.

Introduzir com uma pipeta nas cavidades quantidades rigorosamente medidas de solução de antibiótico compreendidas entre 0,10 e 0,15 ml, conforme o diâmetro.

Para cada amostra, fazer pelo menos 4 repetições de difusão com cada concentração, de forma a que cada doseamento seja objecto de uma avaliação de 32 zonas de inibição

7.3. Incubação

Incubar as placas durante cerca de 18 horas a 28-30 ° C.

8. Avaliação



Medir o diâmetro das zonas de inibição, de preferência, por projecção. Inscrever as medidas em papel semilogarítmico, correlacionando o logaritmo das concentrações com os diâmetros das zonas de inibição. Traçar as rectas da solução-padrão e do extracto. Na ausência de interferências, as duas rectas devem ser paralelas.

O logaritmo da actividade relativa é calculado por meio da seguinte fórmula:

Actividade real = actividade esperada  $\times$  actividade relativa.

#### 9. Reprodutibilidade

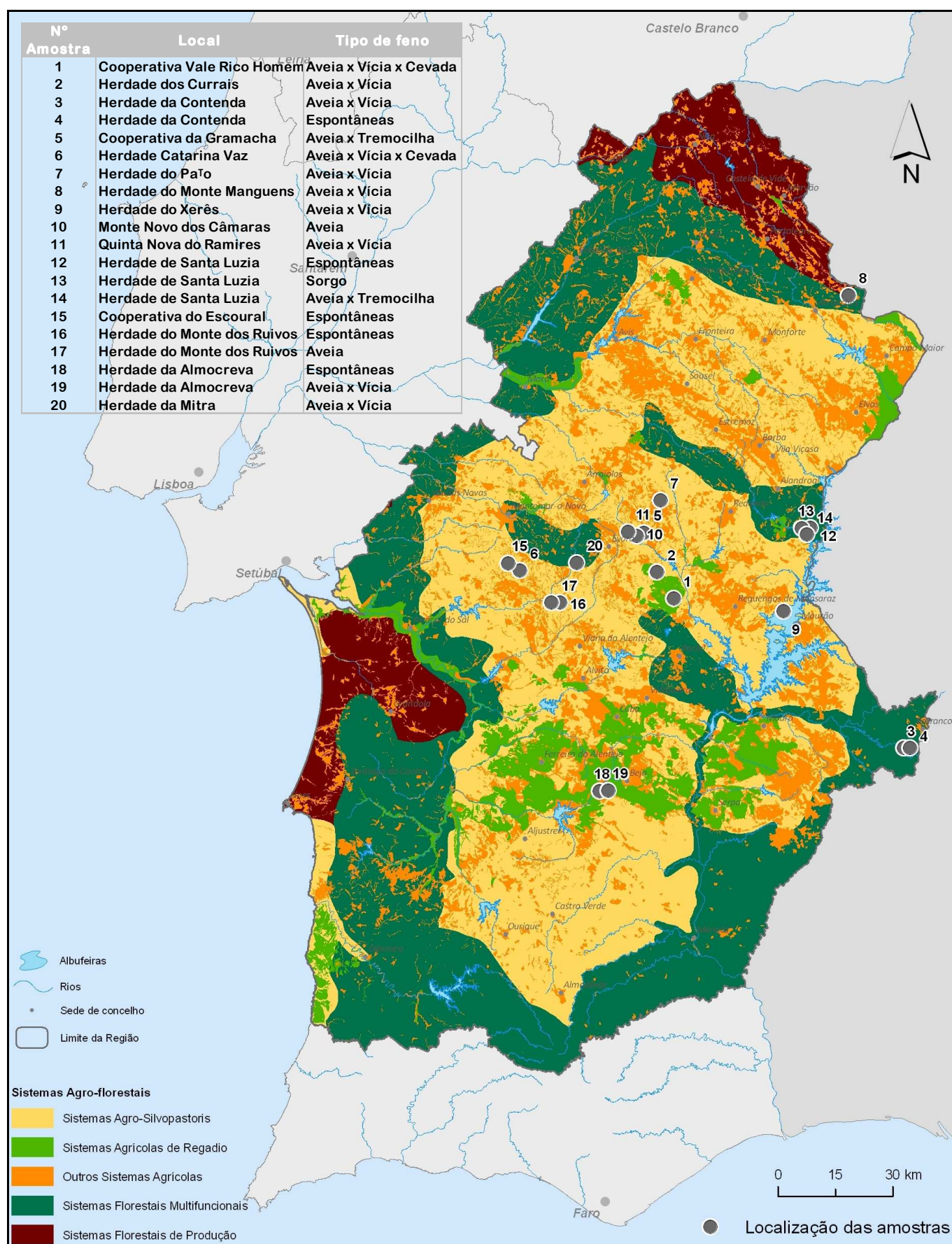
A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas efectuadas na mesma amostra não deve ultrapassar 10 %, em valor relativo.

(1)( ) Recolher 20 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.

(2)( ) Recolher 4 ml de extracto e completar para 100 ml com o tampão num balão aferido.(1) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.(2) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.(3) O negro de amido serve para caracterizar as zonas de inibição das soluções-padrão (aneis azuis).(4) Esta estirpe, isolada pela LUFA em Kiel, apresenta um crescimento mais rápido do que *S. aureus* ATCC 6538 P.(5) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.(6) Estirpe isolada pela LUFA, em Kiel.(7) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.(8) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial, de composição análoga e conduzindo aos mesmos resultados.(9) Pode ser utilizado qualquer meio de cultura comercial de composição análoga e que conduza aos mesmos resultados.

## **ANEXO II – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE PRODUÇÃO DOS FENOS AMOSTRADOS**

## Localização dos pontos de produção dos fenos amostrados



Fonte: Plano Regional de Ordenamento do Território do Alentejo, (2010) -Subsistema das Actividades Agro-florestais.